

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 719 316

(21) N° d'enregistrement national :

94 05174

(51) Int Cl^e : C 12 N 15/11

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 28.04.94.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 03.11.95 Bulletin 95/44.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : I.D.M. IMMUNO-DESIGNED
MOLECULES (société anonyme) — FR.

(72) Inventeur(s) : Midoux Patrick, Erbacher Patrick,
Roche-Degremont Annie-Claude et Monsigny Michel.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Grosset-Fournier & Demachy Sarl.

(54) Nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère, leur procédé de préparation et leur utilisation pour la transfection de cellules.

(57) L'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_2^+ libres des susdits motifs et étant tel que :

- les fonctions NH_2^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10 %, avantageusement de 45 % à 70 %, notamment de 60 %, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,
- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes :
 - ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
 - ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,
 - les fonctions NH_2^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substitués par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30 % de fonctions NH_2^+ libres.

FR 2 719 316 - A1



NOUVEAUX COMPLEXES D'ACIDE NUCLEIQUE ET DE POLYMER, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR LA TRANSFECTION DE CELLULES.

L'introduction d'un gène étranger dans une cellule est d'un grand intérêt pour la thérapie génique. Tandis que dans les expériences *in vitro*, des méthodes générales utilisant la précipitation par le phosphate de calcium, le dextran DEAE, ou les lipides cationiques sont appropriées, des méthodes plus sélectives sont nécessaires pour transférer de façon spécifique un gène dans une population de cellules données, dans le but de développer une thérapie génique. Parmi ces méthodes sélectives, le transfert de gène peut être obtenu en utilisant, soit un matériel viral modifié, allant d'un virus de vaccine à un rétrovirus, soit des liposomes ciblés, soit des complexes de gènes et de macromolécules ciblés. Les complexes ADN/vecteurs tels que asialoorosomucoïde, insuline ou transferrine liés à la polylysine ont été déjà proposés comme vecteurs guides de plasmides permettant la transfection de cellules selon un procédé d'endocytose induit par les récepteurs correspondants: le récepteur spécifique des galactosides (lectine) pour l'asialoorosomucoïde, le récepteur de l'insuline et le récepteur de la transferrine.

Il a été établi que de nombreuses cellules animales possèdent des lectines membranaires [Monsigny M., Roche A.C., Kieda C., Midoux P., Obrenovitch A. Characterization and biological implications of membrane lectins in tumor, lymphoid and myeloid cells. *Biochimie*, 1988; 70: 1633-49; Varki A. Selectin and other mammalian sialic acid binding lectins. *Curr. Op. Cell. Biol.*, 1992, 4: 257-66] qui reconnaissent spécifiquement des osides de structures diverses. En particulier, la lectine membranaire des cellules du parenchyme hépatique qui reconnaît des structures glucidiques comportant un résidu galactose en position terminale, c'est-à-dire un galactose ayant toutes ses fonctions alcooliques libres, ce qui est le cas de glycoprotéines sériques désialysées [Ashwell G., Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, 51: 531-54].

La spécificité de ces lectines dépend du type de cellules et par conséquent, les lectines membranaires sont de bons candidats pour le transfert de gène par des complexes glycoconjugués/ADN comme porteurs spécifiques. Les glycoconjugués solubles portant des résidus de sucre définis ont été utilisés pour introduire efficacement des médicaments, y compris des drogues cytotoxiques, des toxines, des immunomodulateurs, des drogues antivirales [Monsigny, M., Roche, A.C., Kieda, C., Midoux, P. and Obrenovitch, A. (1988) *Biochimie* 70:

1633-1649 2; Roche, A.C., Midoux, P., Pimpaneau, V., Nègre, E., Mayer, R. and Monsigny, M. (1990) Res. Virol. 141: 243-249] et des oligonucléotides [Bonfils E., Depierreux C., Midoux P., Thuong N.T., Monsigny M., Roche A.C. Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. Nucleic Acids Res., 1992, 20: 4621-9; Bonfils E., Mendès C., Roche A.C., Monsigny M., Midoux P. Uptake by macrophages of a biotinylated oligo- α -deoxythymidylate by using mannosylated streptavidin. Bioconjugate Chem., 1992, 3: 277-84].

Le transport des plasmides par des macromolécules susceptibles d'être reconnues spécifiquement par des composés de la membrane plasmique des cellules cibles relève d'une démarche imitant le mécanisme d'entrée du matériel génétique viral dans la cellule. Dans tous les cas décrits jusqu'à présent, le complexe plasmide-transporteur macromoléculaire est reconnu spécifiquement par un récepteur membranaire qui entraîne le complexe dans des vésicules d'endocytose, dans des endosomes, et probablement dans d'autres compartiments intracellulaires plus profonds, éloignés de la membrane plasmique.

Cependant, le passage transmembranaire de l'ADN plasmidique est une étape critique vis à vis de la libération dudit ADN dans le cytosol et/ou le noyau, où le gène sera exprimé.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes stables d'acide nucléique et de polymère substitué.

L'invention a également pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitués susceptibles, en se dissociant, de relarguer l'acide nucléique, afin de permettre une bonne expression de l'acide nucléique dans les cellules.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué ne présentant pas de signaux de reconnaissance et susceptibles de transfecter plusieurs types de cellules.

L'invention a pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué présentant des signaux de reconnaissance reconnus par des récepteurs membranaires, conférant un caractère sélectif de la transfection vis à vis de différents types cellulaires.

L'invention a pour objet un procédé de transfection spécifique *in vitro* ou *in vivo*.

L'invention a également pour objet de nouveaux conjugués de polylysine susceptibles d'être complexés à un acide nucléique en vue de la transfection sélective d'une cellule.

L'invention a également pour objet de nouvelles compositions pharmaceutiques contenant, à titre de substance active, un complexe d'ADN et de polymère substitué, notamment de polylysine substituée.

5 L'invention a également pour objet de nouveaux complexes d'acide nucléique et de polymère substitué possédant une haute solubilité dans le sérum physiologique et divers milieux de cultures, susceptibles d'être administrés *in vivo* à des doses très élevées.

10 Dans une de ses définitions les plus générales, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique qui est chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant des motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

15 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

20 → ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

25 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique, après substitution par les susdits résidus et par les susdits signaux de reconnaissance, contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

30 L'originalité de l'invention repose sur l'utilisation d'un polymère substitué par une quantité suffisante de résidus permettant,

i) de former des complexes stables avec un acide nucléique, ARN et ADN, notamment l'ADN, par interactions électrostatiques avec les charges négatives de l'acide nucléique, notamment de l'ADN et le reste des charges positives du polymère substitué par les susdits résidus, et

35 ii) de faciliter la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique afin de permettre une bonne expression du gène dans les cellules.

En effet, le susdit polymère substitué permet une condensation de l'ADN qui reste très forte par suite d'un phénomène coopératif entre les charges

positives et négatives du polymère et de l'ADN. Le polymère substitué par exemple à 58% avec un susdit résidu possède moins de charges positives, ce qui réduit la coopérativité des interactions et facilite la dissociation entre l'ADN et le polymère.

5 La dissociation du complexe peut être mesurée dans les conditions décrites à propos de la figure 6.

Pris isolement, le conjugué polymérique contient des monomères portant des fonctions NH_2 libres, susceptibles dans les conditions de pH appropriées ($\text{pH} < 10$), de devenir NH_3^+ .

10 Par ailleurs, la présence d'un signal de reconnaissance membranaire cellulaire n'est pas obligatoire.

L'expression selon laquelle "les résidus substituant NH_3^+ ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire" signifie qu'ils ne correspondent à aucun signal dans la mesure des connaissances
15 actuelles de la littérature.

Par signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, on désigne généralement une molécule ou un complexe moléculaire capable de reconnaître sélectivement un ligand (affinité signal-récepteur $\geq 10^3 \text{l/mole}$).

20 Le nombre de signaux de reconnaissance qui substituent les NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus varie de 0 à 40%.

Etant donné que le nombre de NH_3^+ libres sur le conjugué polymérique doit être d'au moins 30%, lorsque les NH_3^+ des susdits motifs sont substitués
25 par 10% de résidus non chargés notamment gluconoyle, les signaux de reconnaissance peuvent être jusqu'à 40% sur les 90% des NH_3^+ non engagés avec des résidus non chargés et/ou sur les groupes hydroxyles des susdits résidus. Lorsque les NH_3^+ des susdits motifs sont substitués par 45% de résidus non chargés, les signaux de reconnaissance peuvent être sur 25 des 55%
30 des NH_3^+ non engagés avec les résidus non chargés et/ou sur les hydroxyles des susdits résidus. En revanche, lorsque le nombre de NH_3^+ engagés dans des liaisons avec les résidus augmente jusqu'à 70%, afin que le conjugué polymérique garde au moins 30% de NH_3^+ libres, les signaux de reconnaissance ne peuvent plus être que sur les hydroxyles des susdits résidus.

35 L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé

de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

L'invention concerne notamment un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et

le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment d'environ 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

- 0 à 40% du nombre des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs étant également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance pouvant l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

L'invention concerne plus particulièrement un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment d'environ 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance

membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance pouvant l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

Dans ces conditions, compte tenu du faible nombre de signaux de reconnaissance, au moins 30% des NH_3^+ du conjugué polymérique sont libres.

Lorsqu'ils sont présents, les signaux de reconnaissance ont pour but de conférer à la transfection la sélectivité de la transfection vis à vis de différents types cellulaires et de rendre efficace la transfection *in vivo*.

Les signaux de reconnaissance ont également pour effet, compte tenu de leur charge généralement neutre, d'entraîner une diminution des charges positives du conjugué polymérique.

Les signaux de reconnaissance sont des molécules de petite masse moléculaire (< 5000 daltons).

Le nombre de molécules de signal de reconnaissance fixé sur le polymère modifié peut être,

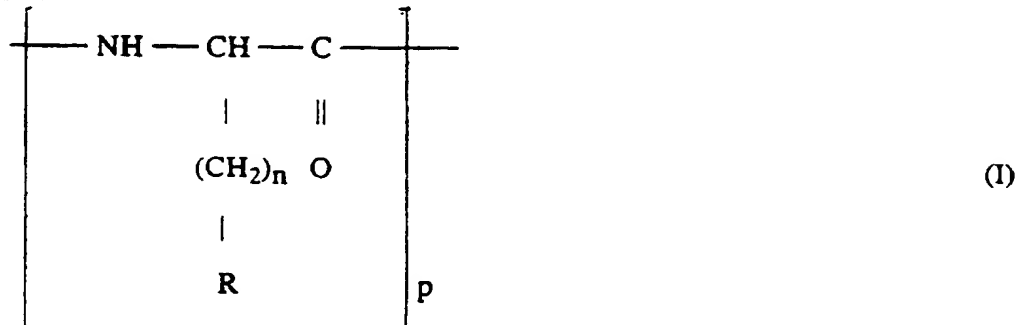
- pour une molécule signal de très haute affinité vis à vis de son récepteur, de 0,5 à 5, avantageusement 1 molécule pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué soit 1 molécule pour environ 50 molécules de polymère substitué;

- pour une molécule signal de moyenne affinité vis à vis de son récepteur, d'environ 10 à environ 100, avantageusement 60 molécules pour environ 10 000 motifs monomères de polymère substitué.

Une molécule signal de très haute affinité correspond à une valeur de K_a d'au moins 10^6 l/mole.

Une molécule signal de moyenne affinité correspond à une valeur de K_a d'au moins 10^4 l/mole.

Selon un mode de réalisation avantageux, dans les complexes de l'invention, le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante:



dans laquelle:

. p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200,

. n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,

. ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionyle, érythrononoyale, thréonoyale, ribonoyale, arabinoyale, xylonoyale, lyxonoyale, gluconoyale, galactonoyale, mannonoyale, glycoheptonoyale, glycooctonoyale,

. m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

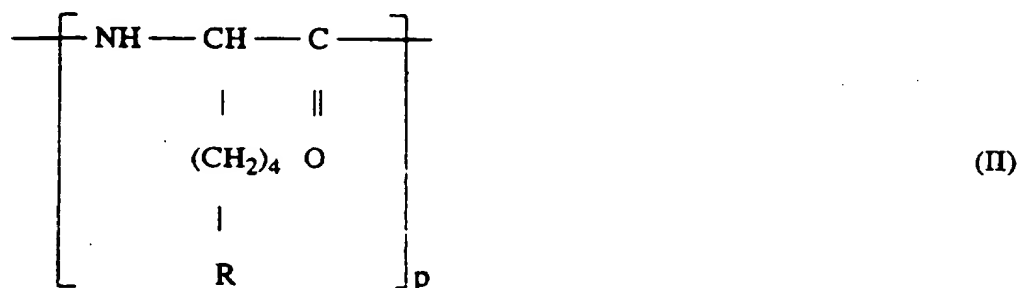
. R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 ,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ ,

* R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe comme définit précédemment, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



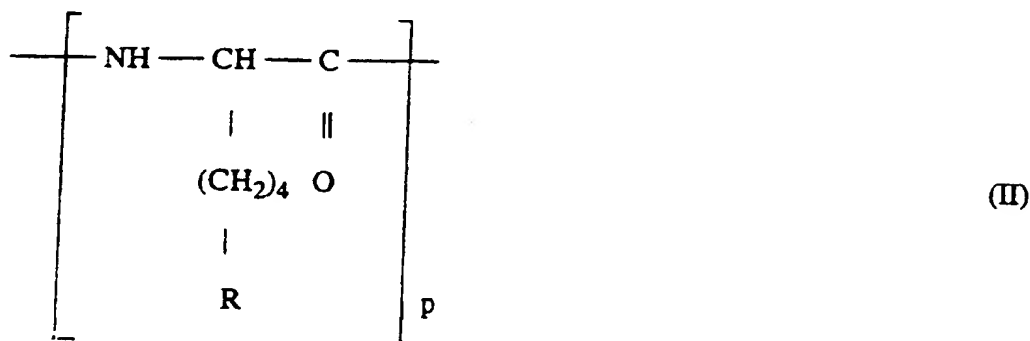
dans laquelle:

. p a les significations indiquées ci-dessus,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ , et de 0 à 25% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Selon un autre mode de réalisation, dans les complexes de l'invention, le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

. p a les significations indiquées ci-dessus,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

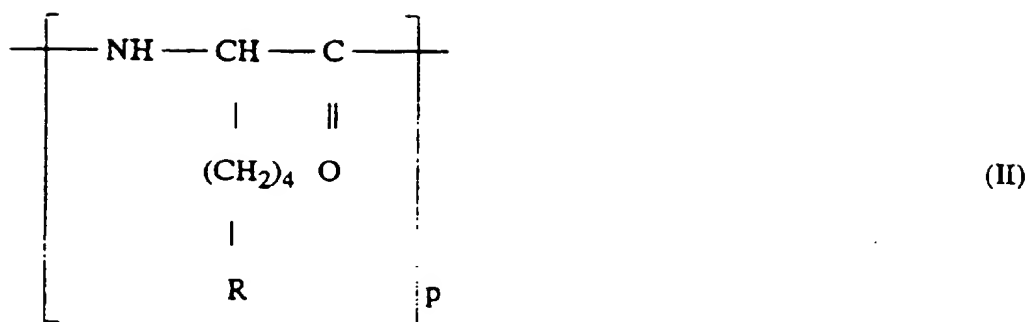
* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ .

Dans cette classe de complexes de l'invention, le polymère est de la polylysine.

Comme le montrent les exemples, les cellules HepG2 (hepatocarcinome humain) sont efficacement transfectées par de la polylysine substituée par $58 \pm 12\%$ (110 ± 22 résidus) gluconoyles (environ 300 fois plus qu'avec le plasmide seul). Les polylysines substituées par peu ou trop de résidus gluconoyles sont pas ou peu efficaces pour obtenir une bonne transfection.

La polylysine substituée par $58 \pm 12\%$ de gluconoyles a permis de transfecter différentes cellules (humaines et murines, adhérentes ou en suspension) avec une grande efficacité, modulée selon le type cellulaire et le promoteur utilisé.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, dans les complexes de l'invention, le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

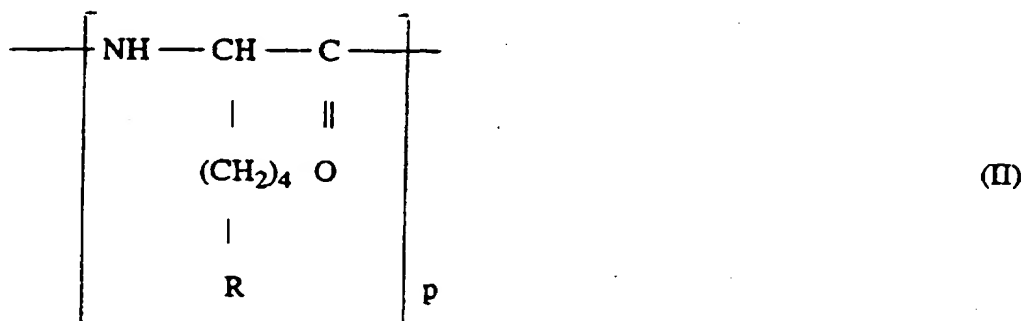
p a la signification indiquée ci-dessus,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour 10 000 motifs.

Selon un autre mode de réalisation, dans les complexes de l'invention, le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

. p a la signification indiquée ci-dessus,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

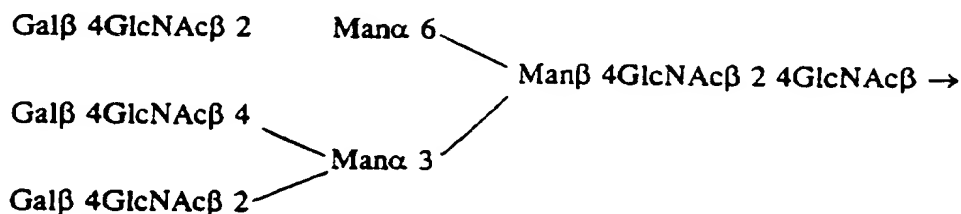
* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

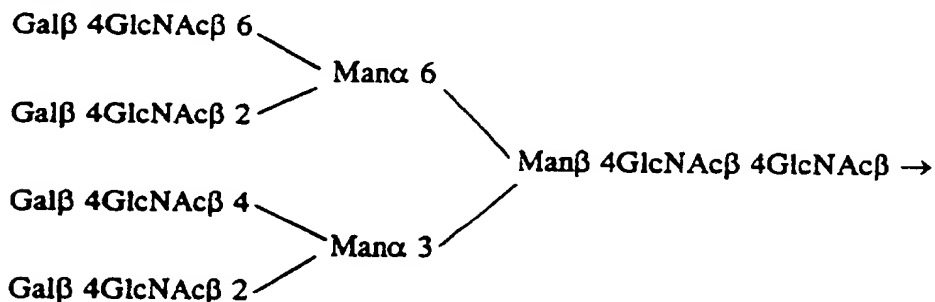
Dans les complexes de l'invention, le signal de reconnaissance peut être choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

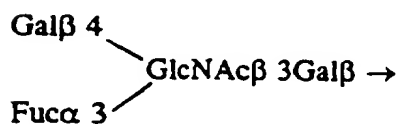
a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



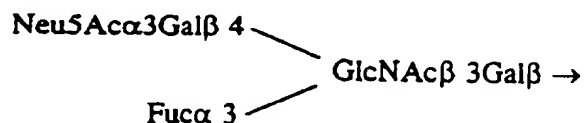
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



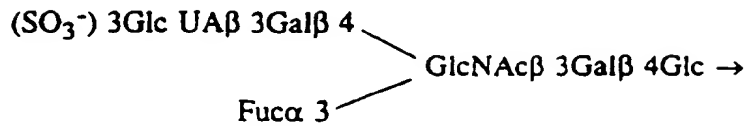
c. Lewis x: LECAM 2/3



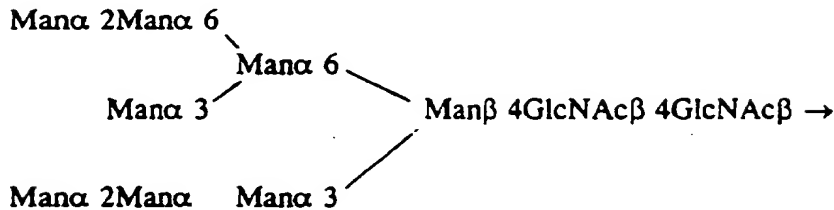
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



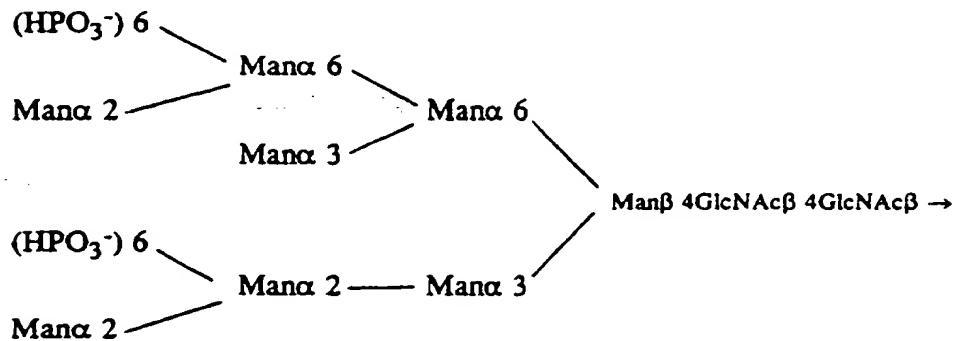
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



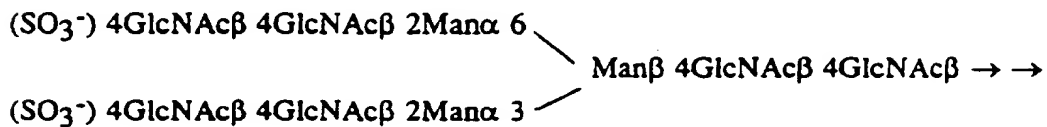
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que par exemple:

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD tel que le récepteur de la fibronectine;

c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et antagonistes: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂

C) Métabolites naturels tels que:

- la biotine,

- le tétrahydrofolate,

- l'acide folique,

- la carnitine.

Dans les complexes de l'invention, l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- gènes contenant la luciférase,

- gènes contenant la β -galactosidase,

- gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,

- gènes conférant la résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine ou la néomycine;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

- récepteurs des lipoprotéines de faible densité, déficient dans les cas d'hypercholestérolémie (foie),

- facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,

- phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),

- adénosine désaminase (immunodéficiences ADA),

- enzymes lysosomiques, tels que la β -glucosidase dans le cas de la maladie de Gaucher,

- dystrophine et minidistrophine (myopathie),

- tyrosine hydroxylase (Parkinson),

- facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),

- CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator (mucoviscidose),

- α 1-antitrypsine,

- cytokines (interleukines, TNF: facteur de nécrose des tumeurs),
- thymidine kinase du virus Herpes simplex,
- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier HLA-B7,

- cytosine désaminase,
- gènes codant pour des ARN sens et antisens,
- gènes codant pour des ribozymes,

c) des gènes à visée vaccinale

- gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

Une classe avantageuse de complexes selon l'invention, comprend ceux dans lesquels:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 100 à environ 500, de préférence 190,

- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées à 60% par des groupements gluconoylé et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^6 l mole^{-1} vis à vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 60 molécules de signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^4 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,

- l'acide nucléique présente un poids moléculaire d'environ $6 \cdot 10^5$ à environ $25 \cdot 10^6$, et

- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,9 à environ 1,1, de préférence d'environ 0,95 à environ 1,05.

L'invention concerne également un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Ce conjugué polymérique est un composant intermédiaire des complexes décrits précédemment.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,
→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives, par

rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

L'invention concerne également un conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70% par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

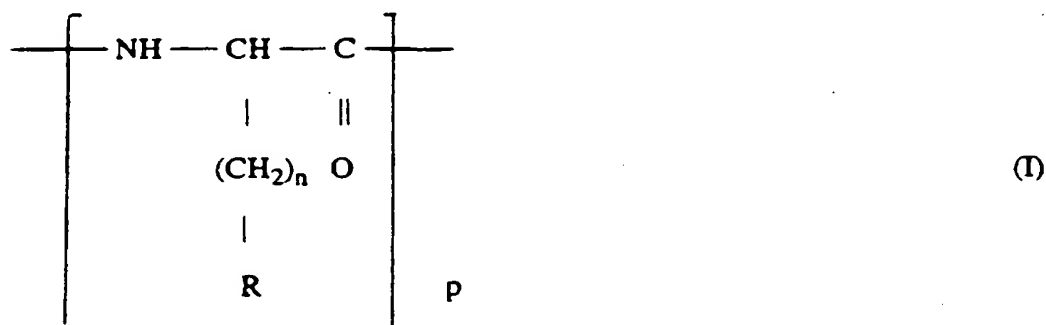
→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

Une classe avantageuse de conjugués polymériques de l'invention contient un groupement polymérique de formule suivante:



dans laquelle:

. p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200
n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,

. ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment

un reste dihydroxypropionyle, érythrononyle, thréonyle, ribonyle, arabinyle, xylonyle, lyxonyle, gluconyle, galactonyle, mannonyl, glycoheptonyle, glycooctonyle, m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

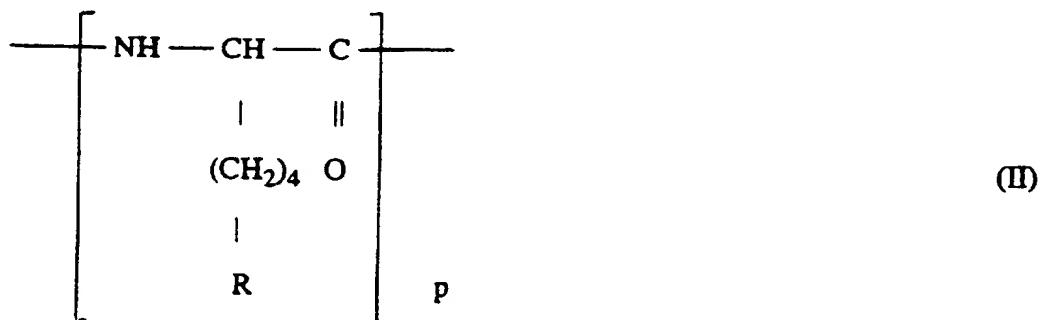
. R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 ,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représente NH_3^+ ,

* R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):

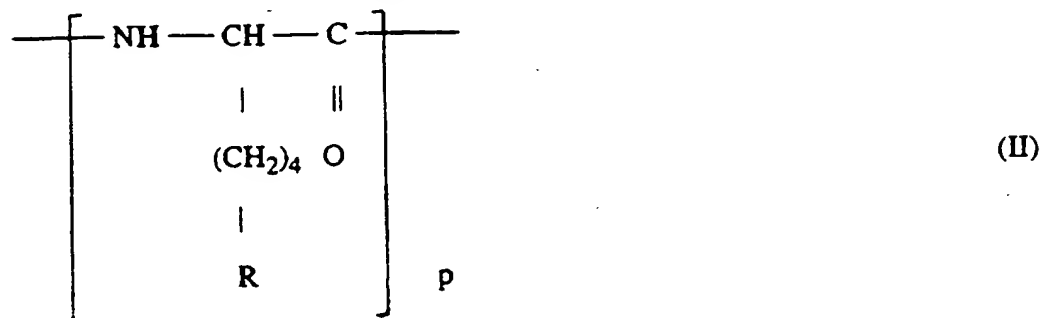


dans laquelle p a les significations indiquées ci-dessus,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée à la ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ .

Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):



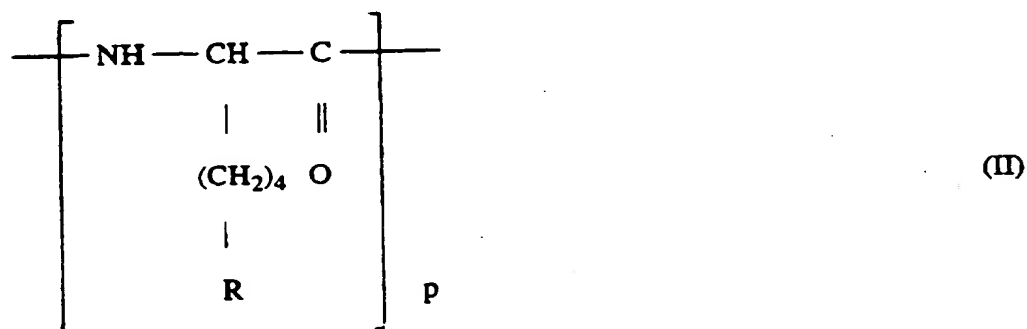
dans laquelle:

- . p a la signification indiquée ci-dessus,
- . ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

- * 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus,

- * le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour 10 000 motifs.

Une autre classe avantageuse de conjugués polymériques selon l'invention contient un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

- . p a la signification indiquée ci-dessus,
- . ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

- * 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

5 Dans les conjugués polymériques de l'invention, le signal de reconnaissance membranaire cellulaire peut être choisi parmi ceux explicités à propos des complexes décrits ci-dessus.

L'invention vise également un procédé de préparation de complexes décrits ci-dessus.

10 De façon générale, un polymère comportant des amines primaires (fonctions NH_3^+ libres) est partiellement substitué par action d'un acide organique hydroxylé (l'acide gluconoïque en particulier), en milieu organique.

Par exemple, un sel de polylysine (notamment sous forme de p-toluène sulfonate) est dissous dans un solvant organique, (notamment le diméthylsulfoxyde) en présence d'une base (notamment la diisopropyléthylamine) et traité par un acide organique hydroxylé activé (notamment la gluconolactone).

15 Les signaux de reconnaissance sont fixés sur le polymère, soit avant soit après l'introduction des acides organiques hydroxylés.

20 Les signaux de reconnaissance peuvent être liés aux groupements aminés du polymère ou aux hydroxyles des acides organiques hydroxylés; ces substitutions suivent l'un quelconques des protocoles connus de l'homme de l'art.

25 Le complexe acide nucléique/conjugué polymérique est obtenu en mélangeant une solution de l'acide nucléique concerné et une solution du conjugué polymérique. De préférence, lesdites solutions sont préparées à partir du sérum physiologique ou d'un tampon ou d'un milieu cytocompatible.

L'invention concerne également l'utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon l'invention, pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis précédemment.

30 L'invention vise également l'utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon l'invention, pour transfecter des cellules qui peuvent être choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- 35 - cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,

. mélanocytes.

- cellules des parois vasculaires;

. endothéliales;

. musculaires lisses;

5 - cellules épithéliales des voies aériennes;

- cellules du système nerveux central;

- cellules cancéreuses;

- cellules du système immunitaire, telles que lymphocytes, macrophages, cellules NK etc...

10 Une méthode de transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de l'invention comprend la mise en présence un complexe de l'invention, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,

15 - relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol des cellules,

- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées.

20 L'acide nucléique est délivré dans le cytosol et/ou dans le noyau de la cellule où il doit s'exprimer.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques, comprenant à titre de substance active, l'un au moins des complexes ou l'un au moins des conjugués selon l'invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 Les complexes ou conjugués de l'invention peuvent également être partie à une trousse ou un kit, comprenant par exemple:

30 - un conjugué polymérique selon l'invention, par exemple, la polylysine, substituée par un résidu entraînant une diminution des charges des groupes NH_3^+ libres, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et le système de régulation du susdit gène,

35 - des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'invention entre le conjugué polymérique et le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

Concernant le signal de reconnaissance, il faut souligner qu'il n'est pas nécessairement présent sur le conjugué polymérique. Il peut en effet être à part
5 dans la trousse et être greffé sur le conjugué polymérique avant l'utilisation. Par ailleurs, le signal de reconnaissance peut être absent de la trousse et l'utilisateur peut, en fonction des cellules à cibler, utiliser le signal de reconnaissance de son choix pour le greffer sur le conjugué polymérique de la trousse.

L'invention concerne également l'utilisation d'un complexe ou d'un
10 conjugué selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné, par exemple, au traitement d'une déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

Les conjugués polymériques et les complexes de l'invention peuvent être
15 utilisés pour transfecter *ex vivo* toute cellule apte à présenter un antigène, par exemple, des précurseurs de macrophages, des macrophages, des cellules B ou des cellules dendritiques.

Lorsqu'on souhaite transfecter des macrophages, ceux-ci peuvent être préparés selon la méthode décrite par M. Chokri et coll. dans *Anticancer Research* 12, 2257-2260, 1992.
20

Les complexes et conjugués polymériques de l'invention peuvent être utilisés pour transfecter des macrophages en dehors de l'organisme, lorsqu'ils sont en milieu de culture, avant ou après séparation par élutriation.

On peut utiliser une méthode analogue à celle utilisée pour la transfection
25 des cellules HepG2, mais en utilisant un oligosaccharide ciblant, par exemple le récepteur du mannose; (pour la transfection des cellules HepG2, on peut se reporter aux exemples ci-après ou à l'article de C. Sureau, J. L. Romet-Lemonne, J. Mullins et M. Essex: "Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, 47, p. 37-47, 1986, ou à l'article de Midoux et al., intitulé:
30 "Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells", *Nucleic Acids Research*, 1993, vol. 21, N° 4, pages 871-878).

Les macrophages transfectés "*ex vivo*" sont réinjectés au patient après vérification de l'efficacité de la transfection selon des méthodes classiques
35 d'immunomarquage.

L'acide nucléique dans le complexe de l'invention peut être:

- soit un gène à visée thérapeutique pour pallier une déficience métabolique congénitale ou acquise, (par exemple, facteurs de coagulation, tel que le facteur VIII ou le facteur IX),

- soit un gène à visée vaccinale (par exemple, un gène codant pour une protéine exprimée à la surface d'une tumeur, ou un gène de protéine virale, bactérienne ou parasitaire).

Dans le cas d'une vaccination par réinjection de macrophages transfectés, la protéine antigénique est exprimée et est en partie présente à la surface du macrophage permettant une présentation antigénique MHC type 1 dépendante.

L'acide nucléique dans le complexe de l'invention peut être également un gène conférant aux macrophages des propriétés nouvelles soit directement, soit par expression de cytokines,

. cytokines ayant un effet directement sur le macrophage, lui conférant des propriétés physiologiques nouvelles;

par exemple: - transfection du gène du γ interféron; dans ce cas le macrophage est auto activé en permanence, ce qui augmente ses propriétés cytotoxiques;

- transfection du gène du $\text{TNF}\alpha$ modifié ou non; dans ce cas il y a augmentation des capacités anti tumorales des macrophages;

. cytokines ayant un effet sur les populations cellulaires au voisinage des macrophages transfectés;

par exemple: - transfection du gène de l'IL2 pour stimuler les cellules T cytotoxiques au voisinage de la tumeur colonisée par les macrophages.

Description des figures

Figure 1:

Elle représente un fragment de polylysine gluconoylée.

Figure 1 bis:

Elle représente un fragment de polylysine dans laquelle certaines des fonctions NH_3^+ de la polylysine sont substituées telles que $\text{R} = \text{NH}_3^+$ ou $\text{NNHCO(CHOH)}_m \text{R}_1$, R_1 ayant les significations indiquées ci-dessus.

Figure 2:

Elle représente le transfert de gène dans les cellules HepG2 en utilisant des polylysines gluconoylées (GlcA-pLK)

Les complexes ADN/polymère formés entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine substituée par différentes quantités de résidus gluconoyles (de 15 à 70%) ont été déterminés par électrophorèse en gel d'agarose. La polylysine substituée par plus de 140 résidus gluconoyles ne peut former un complexe avec le plasmide.

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μ M de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec chacun des conjugués. Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées en mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2, en fonction du rapport molaire GlcA/pLK et du degré de substitution de polylysine (%).

Figure 3:

Elle représente le transfert de gène dans les cellules HepG2 en utilisant des polylysines gluconoylées (GlcA-pLK)

Les complexes ADN/polymère formés entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine substituée par différentes quantités de résidus gluconoyles (de 15 à 70%) ont été déterminés par électrophorèse en gel d'agarose. La polylysine substituée par plus de 140 résidus gluconoyles ne peut former un complexe avec le plasmide. Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μ M de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec chacun des conjugués. Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans des lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par rapport à celle obtenue dans la même expérience lors de la transfection des cellules HepG2 avec le conjugué polylysine lactosylé (Lact₆₀pLK). En ordonnés, on a représenté les valeurs RLU/RLU de Lact₆₀pLK, en fonction du rapport molaire GlcA/pLK d'une part, et de degré de substitution de polylysine (%).

Figure 3 bis:

Elle concerne l'influence du nombre de résidus lactose.

L'activité optimale d'un conjugué polymérique (polymère substitué par des lactoses) apparaît lorsque 30% des groupes NH_3^+ sont substitués par du lactose.

Figure 4:

Elle concerne le transfert de gène dans différentes cellules en utilisant la polylysine gluconoylée (GlcA-pLK)

Un complexe ADN/polymère a été formé entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine substituée par 120 résidus gluconoyles. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec la polylysine gluconoylée.

Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine. MacroH = macrophages humains dérivés de monocytes; RBE4 = cellules endothéliales de cerveau de rat; HEL = cellules leucémiques de la lignée érythroïde.

Figure 5:

Elle représente le transfert de gène dans différentes cellules en utilisant la polylysine gluconoylée (GlcA-pLK)

Un complexe ADN/polymère a été formé entre le plasmide CMVLuc et la polylysine substituée par 120 résidus gluconoyles. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 4 heures en présence de 100 μM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide complexé avec la polylysine gluconoylée. Le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine. 3LL = cellules (souris) du carcinome pulmonaire de Lewis; MacroH = macrophages humains dérivés de monocytes; RBE4 = cellules endothéliales de cerveau de rat; HepG2 = hépatocarcinome humain; HEL = cellules leucémiques de la lignée érythroïde; K562 = cellules leucémiques de la lignée érythroïde.

Figure 6:

Elle concerne la mesure de la dissociation des complexes formés entre le plasmide pSV2Luc et la polylysine (degré de polymérisation = 190) substituée par des lactoses

Des complexes ont été formés entre le plasmide pSV2Luc avec soit la polylysine (pLK), soit la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK), soit la polylysine substituée par 80 résidus de lactose (Lact₈₀pLK). Les complexes ont été formés dans une solution de NaCl 0.15 M. la concentration de NaCl a été ensuite augmentée. Les solutions de complexes ADN/polymère à différentes concentrations en NaCl ont été filtrées au travers d'une membrane de nitrocellulose 0.45 μ m. dans cette expérience, l'ADN non complexé à la polylysine passe au travers du filtre alors que l'ADN complexé est retenu sur le filtre. La quantité d'ADN dissociée de la polylysine a été déterminée en mesurant la quantité d'ADN présent dans les filtrats en utilisant le DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole), ($\lambda_{em} = 450$ nm; $\lambda_{exc} = 360$ nm) (Sigma)) comme sonde fluorescente. On a porté en ordonnées le pourcentage d'ADN lié/ADN libre, en fonction de la concentration en NaCl (M). La courbe comportant des O correspond à pLK, celle comportant des • correspond à pLK,-Lact₆₀ et celle des ∇ correspond à pLK,-Lact₈₀.

Figure 7

Elle concerne la mesure de la solubilité des complexes.

Des complexes ADN/polymère ont été formés dans une solution de NaCl 0.15 M entre le plasmide pSV2Luc avec soit la polylysine (pLK), la polylysine gluconoylée (GlcA₁₂₀pLK) ou la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK). Après 30 minutes à 20°C, l'absorbance à 610 nm des solutions a été mesurée.

Tableau 1. Transfection des cellules HepG2 par la polylysine lactolysée et gluconoylée.

RLU x 10 ⁻³ /mg de protéine	5.2	19	671	650
Lact/pLK	0	30	30	60
GlcA/pLK	0	0	30	0

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C en présence de 100 μ M de chloroquine et 1.5 nM de plasmide complexé avec chacun des conjugués. Après 4 heures, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de

chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2. Lact/pLK est le nombre de molécules de lactose par molécule de polylysine et GlcA/pLK est le nombre de molécules de gluconoyl par molécule de polylysine.

Tableau II. Transfection des cellules HepG2 par la polylysine gluconoylée et biotinylée.

	RLU x 10 ⁻³ /mg de protéine
ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep/Bio-LactBSA	966
ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep/Bio-BSA	248
ADN/GlcA, Bio-pLK/Strep	237
ADN/GlcA, Bio-pLK	67
ADN	0.2

Les cellules HepG2 ont été incubées à 37°C en présence de 100 µM de chloroquine avec 1.5 nM de plasmide libre ou complexé avec chacun des conjugués. Après 4 heures, le milieu a été éliminé et les cellules ont été incubées en absence de chloroquine et de plasmide. L'expression du gène de la luciférase a été déterminée 48 heures plus tard en mesurant l'activité de la luciférase dans les lysats cellulaires. Les valeurs relatives de la lumière émise (RLU) ont été exprimées par mg de protéine ce qui correspond à 1,2 million de cellules HepG2. GlcA,Bio-pLK = polylysine substituée par 60 gluconoyles et 2.5 biotines; Strep = streptavidine; Bio-LactBSA = sérum albumine lactolysée et biotinylée; Bio-BSA = sérum albumine biotinylée.

Composants chimiques

La luciférine, la chloroquine, le Triton X 100 et l'acide bicinchoninique proviennent de Sigma (St. Louis, MO USA); la L-glutamine, le diméthylsulfoxyde (Me₂SO), l'ATP, le glycérol et MgCl₂ proviennent de Merck (Darmstadt, Allemagne); le dithiothréitol et le D-gluconolactone proviennent de Serva (Heidelberg, Allemagne); la diisopropyléthylamine, l'acide p-toluène sulfonique, l'EDTA proviennent de Aldrich (Strasbourg, France); Dowex 2 x 8, (0,3-0,9 mm de diamètre) provient de Bio-Rad (Richmond, CA); le 4-isothiocyanatophényl-β-D-lactoside, le 4-isothiocyanatophényl-β-D-galactopyranoside sont préparés comme décrit précédemment (Monsigny, M., Roche, A.C. et Midoux, P. (1984), Uptake of neoglycoproteins via membrane

lectin(s) of L 1210 cells evidenced by quantitative flow cytofluorometry and drug targeting. *Biol., Cell.*, **51**, 187-196); la poly-L-lysine, HBr (30 000-50 000) (poids moléculaire moyen = 40 000, degré de polymérisation = 190) provient de Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suisse). La poly-L-lysine, HBr (1 g dans 200 ml de H₂O) est passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, sous forme OH⁻, 0,3-0,9 mm de diamètre, 35 x 2,5 cm) de façon à enlever le bromure (Derrien, D., Midoux, P., Petit, C., Negre, E., Mayer, R., Monsigny, M. et Roche, A.C. (1989), Muramyl dipeptide bound to poly-L-lysine substituted with mannose and gluconoyl residues as macrophage activators. *Glycoconjugate, J.*, **6**, 241-255) qui est très cytotoxique pour les cellules (Weiss, S.J., Test, S.T., Eckmann, C.M., Roos, D. et Regiani, S. (1986), Brominating oxidants generated by human eosinophils., *Science*, **234**, 200-202). La solution effluente est neutralisée avec 10% d'acide p-toluène sulfonique dans l'eau (un composé non cytotoxique) et lyophilisée. La sérum albumine bovine lactolysée (Lact-BSA, comportant un nombre moyen de 39 résidus de lactose) est préparée comme décrit précédemment (Roche, A.C., Barzilay, M., Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N. and Monsigny, M., (1983), Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by lewis lung carcinoma cells. *J., Cell. Biochem.*, **22**, 131-140; Monsigny, M., Roche, A.C. et Midoux, P. (1984), Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L 1210 cells evidenced by quantitative flow cytofluorometry and drug targeting. *Biol., Cell.*, **51**, 187-196).

Préparation de la polylysine gluconoylée

La poly-L-lysine sous forme hydromide, pLK, HBr 30 000 - 50 000 (masse moléculaire moyenne = 40 000; degré de polymérisation moyen = 190) provient de Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suisse). La polylysine, HBr (1 g dans 200 ml H₂O) est passée sur une colonne échangeuse d'anions (Dowex 2 x 8, forme OH⁻; 35 x 2,5 cm) dans le but d'enlever le brome qui est toxique pour les cellules. La solution de polylysine est neutralisée avec une solution d'acide p-toluène sulfonique à 10% dans l'eau puis lyophilisée.

La polylysine est partiellement substituée avec des résidus gluconoyles (GlcA) comme suit: la polylysine sous forme p-toluène sulfonate (50 mg; 0.86 μ moles) dissoute dans 3 ml de DMSO (diméthylsulfoxyde) en présence de diisopropyléthylamine (37 μ l; 205 μ moles) et 1% d'eau, est mise à réagir pendant 24 h à 20°C avec des quantités variables de D-gluconolactone allant de 11 mg (61 μ mol) à 35 mg (194 μ mol). La polylysine gluconoylée est précipitée en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 min),

le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau bidistillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de résidus gluconoylé fixé par molécule de la polylysine, déterminé en mesurant le nombre moyen de résidus ϵ -NH₂ lysine libre restant sur la polylysine en utilisant le dosage colorimétrique à l'acide 2,4,6-trinitrobenzene sulfonique TNBS (Fields, R. (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem., J.*, **124**, 581-590), est trouvé égal à 105 ± 15 . Le poids moléculaire moyen est de 58 000.

Préparation de conjugués de polylysine lactolysée et gluconoylée.

Les polylysines substituées soit avec 30 résidus de lactose (Lact₃₀pLK) soit avec 60 résidus de lactose (Lact₆₀pLK) ont été préparées comme précédemment décrit (Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M., & Roche, A.C. (1993), Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids, Res.*, **21**, 871-878). La polylysine lactolysée contenant 30 résidus de lactose (50 mg; 0.745 μ mol) est mise à réagir pendant 24h à 20°C avec la D-gluconolactone (7,6 mg; 43 μ mol) en présence de diisopropyléthylamine (24 μ l; 200 μ mol) et 1% de H₂O. Le polymère Lact₃₀-GlcA-pLK est précipité et purifié comme décrit précédemment. Le nombre moyen de résidus gluconoyles liés par molécule de conjugué est déterminé en mesurant les groupes α -amino de la lysine restant sur la polylysine en utilisant la méthode colorimétrique TNBS (Fields, R. (1971) The measurement of amino groups in proteins and peptides, *Biochem., J.*, **124**, 581-590) est trouvé égal à 30.

Biotinylation de la polylysine et de la polylysine gluconoylée.

La polylysine gluconoylée (contenant 60 résidus gluconoyles) est substituée par de la biotine: le polymère (20 mg; 0.33 μ mol) dissous dans 0.5 ml de tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0.1 M, pH 9.0, contenant NaCl 0.3 M, est mis à réagir pendant 20 h à 20°C avec 0.93 mg (1.7 μ mol) de sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate (NHS-LC-biotin, Pierce). Le polymère est précipité en ajoutant 10 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (1800 g x 15 min), le culot est lavé avec de l'isopropanol et récupéré après une nouvelle centrifugation. Le culot est repris dans l'eau bidistillée et la solution est lyophilisée. Le nombre moyen de résidu biotine fixé par molécule de polymère, déterminé en utilisant le dosage colorimétrique adapté de Green (Green, N. M. (1965), A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding dyes by avidin. *Biochem., J.*, **94**, 23c-24c) en

utilisant l'acide 2-(4'-hydroxyazobenzène)benzoïque (HABA) et la streptavidine, est trouvé égal à 2.5.

Préparation de néoglycoprotéines biotinylées

5 La BSA et la BSA lactosylée (Lact-BSA) (0.23 μ mole) dissoutes dans 5 ml de tampon de carbonate sodium 0.1 M, pH 9.0, contenant NaCl 0.3 M sont mises à réagir pendant 20 h à 20°C, avec NHS-LC-biotine (0.65 mg; 1,2 μ mol). Les conjugués sont purifiés par filtration sur gel de Trisacryl GF05 (taille de
10 colonne 20 x 2 cm) (Sepracor, Villeneuve la Garenne, France) dans H₂O contenant 5% de n-butanol, puis lyophilisé. Les nombres moyens de résidus de biotine liés par molécule de protéine sont déterminés en utilisant une méthode colorimétrique avec HABA, adaptée de Green (Green, N. M. (1965), A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding dyes by avidin. Biochem., J., 94, 23c-24c) et sont de 1 pour BSA et 2 pour Lact-BSA. Les
15 masses moléculaires moyennes de BSA et Lact-BSA sont 68 000 et 87 200 respectivement.

Cellules et cultures de cellules

20 Les lignées cellulaires HepG2 (hépatocarcinome humain, ATCC 8065 HB) qui possèdent une lectine membranaire reconnaissant les glycoprotéines se terminant par des résidus β -D-galactose (Schwartz, A.L., Fridovich, S.E., Knowles, B.B. & Lodish, H.F. (1981) Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. J., Bio., Chem., 256, 8878-8881), les cellules HEL (ATCC TIB 180) et K-562 (ATCC CCL 243) sont
25 cultivées respectivement en milieu DMEM (GIBCO, Reufrewshire, U.K.) et en milieu RPMI 1640 plus 10% de sérum bovin foetal (GIBCO) désactivé par la chaleur, plus 2 mM de L-glutamine (Merck), plus des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine) (Eurobio., Paris, France). Les macrophages humains dérivant de monocytes du sang sont préparés
30 comme décrit dans Roche et al., 1985 (Roche, A.C., Midoux, P., Bouchard, P. and Monsigny, M. (1985) Membrane lectins on human monocytes: maturation-dependent modulation of 6-phosphomannose and mannose receptors. FEBS Letters, 193, 63-68). Les cellules 3LL sont cultivées comme décrit dans Roche et al., 1983 (Roche, A.C., Barzilay, M., Midoux, P., Junqua, S., Sharon, N. and Monsigny, M. (1983) Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by lewis
35 lung carcinoma cells. J., Cell., Biochem., 22, 131-140). Les cellules RBE4, données par P.O. Couraud (Hôpital Cochin, Paris) sont cultivées sur collagène dans un milieu α -MEM et HamF₁₀ (50/50, volume; volume) plus 10% de sérum

bovin foetal désactivé par la chaleur, plus 2 mM de L-glutamine, plus des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) en présence de TGFβ.

5 Les plasmides

Le plasmide pSV2Luc (5.0 kb) est fourni par le Dr. A.B. Brasier (Massachusetts General Hospital, Boston) (Brasier, A.R., Tate, J.E. & Habener, J.F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*, 7, 1116-1123). Le plasmide CMVLuc est fourni par le Dr. A. Dautry-Varsat (Institut Pasteur, Paris).

Formation de complexes plasmide/conjugué de polylysine optimaux.

Seuls les complexes pour lesquels aucune migration de l'ADN se produit en électrophorèse sur un gel d'agarose, et ainsi appelés complexes d'ADN/polymère optimaux sont utilisés pour transfecter les cellules. Les rapports molaires entre le polymère et l'ADN nécessaires pour former des complexes plasmide pSV2Luc/polymère optimaux sont déterminés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.6%: les complexes sont préparés en ajoutant goutte à goutte sous mélange constant, des quantités variables de conjugués de polylysine dans 60 µl de DMEM, à 2 µg (0.6 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 140 µl de DMEM. Après incubation pendant 30 minutes à 20°C, 20 µl de chaque échantillon est analysé par électrophorèse à travers un gel d'agarose à 0.6% contenant du bromure d'éthidium pour visualiser l'ADN dans un tampon Tris borate EDTA (Tris 95 mM, acide borique 89 mM et EDTA 2.5 mM), pH 8.6.

Préparation des complexes ADN/vecteurs.

Complexes plasmide pSV2Luc/conjugué de polylysine.

Des complexes ADN/polymère optimaux sont préparés en ajoutant goutte à goutte sous agitation constante la polylysine ou un conjugué de poly-L-lysine (Lact₆₀pLK, GlcA_x-pLK, 30 ≤ x ≤ 130, avec Lact₃₀pLK, ou Lact₃₀-GlcA₃₀-pLK) dans 0.6 ml de DMEM à 20 µg (6 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 1.4 ml de DMEM. La solution est maintenue pendant 30 minutes à 20°C.

Complexes de plasmide pSV2Luc/pLK-streptavidine-néoglycoprotéine.

Les complexes de plasmide pSV2Luc/polylysine biotinylée optimaux, sont formés en ajoutant goutte à goutte sous mélange constant 10 µg (172 pmol) de polylysine gluconoylée et biotinylée (contenant 60 résidus gluconoyles) dans 290 µl de DMEM à 10 µg (3 pmol) de plasmide pSV2Luc dans 0.7 ml de DMEM

(rapport molaire entre le polymère et l'ADN proche de 57:1). La solution est maintenue pendant 30 minutes à 20°C. Ensuite les néoglycoprotéines biotinylées (Lact-BSA et BSA) (377 pmol) dans 0.5 ml de DMEM sont ajoutées avec agitation constante à 1 ml de complexe plasmide pSV2Luc/polylysine biotinylée, et puis la streptavidine (27.5 µg; 490 pmol) dans 0.5 ml de DMEM est ajoutée sous agitation (rapport molaire entre la néoglycoprotéine et l'ADN voisin de 125:1) et la solution est maintenue pendant 30 minutes à 20°C.

Transfert de gène

5 x 10⁵ cellules HepG2 par puits sont déposées au jour 0 sur des plaques de culture de tissus de 12 puits, respectivement. Au jour 1, après avoir retiré le milieu, la solution (2 ml) contenant le complexe plasmide/conjugué de polylysine supplémenté avec 1% de sérum bovin foetal inactivé par la chaleur, et porté à une valeur de concentration de 100 µM dans la chloroquine (Luthman, H & Magnusson, G. (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308), est ajoutée dans le puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le surnageant est retiré et 2 ml de milieu DMEM frais complet sont ajoutés et les cellules sont ensuite incubées pendant 48 h à 37°C.

Test à la luciférase

L'expression génétique de la luciférase est mesurée par luminescence selon la méthode décrite par De Wet et al., 1987, (De Wet, J.R., Wood, K.V., De Luca, M., Helinski, D.R. & Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol., Cell., Biol., 7, 725-737). Le milieu de culture est retiré, et les cellules sont récoltées après incubation à 37°C dans du PBS contenant 0.2 mg/ml de EDTA et 2.5 µg/ml de trypsine (GIBCO) et lavées 3 fois avec du PBS. Le tampon d'homogénéisation (200 µl; 8 mM MgCl₂, 1 mM de dithiothréitol, 1 mM d'EDTA, 1% de Triton X 100 et 15% de glycérol, 25 mM de tampon Tris-phosphate pH 7.8), est ajouté au culot. La suspension est agitée par un vortex et conservée pendant 10 min à 20°C. La solution est envoyée en bas du tube par centrifugation (5 min 800 g). L'ATP (95 µl d'une solution 2 mM dans le tampon d'homogénéisation sans Triton X 100) est ajouté à 60 µl du surnageant et la luminescence est enregistrée pendant 4 secondes en utilisant un luminomètre (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbach, Allemagne) sur addition automatique de 150 µl de luciférine 167 µM dans l'eau; les mesures sont faites en triple.

Dosage de protéine

Un dosage de protéine est effectué pour chaque échantillon en utilisant la méthode colorimétrique d'acide bicinchoninique (BCA) (Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal., Biochem.*, **150**, 76-85), adaptée par Hill et Straka (1988) (Hill, H.D. & Straka, J.G. (1988) Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal., Biochem.*, **170**, 203-208) pour se débarrasser de la présence de DTT dans le tampon d'homogénéisation. La mesure de l'expression de luciférase est exprimée comme unité de lumière relative (RLU) par mg de BSA (albumine libre d'acide gras purifiée et cristallisée, A7511, Sigma), 1 mg BSA correspondant à $1,2 \times 10^6$ cellules HepG2.

Résultats

Polylysine gluconoylée

La poly-L-lysine (masse moléculaire moyenne de la forme salifiée 40.000; degré de polymérisation moyen 190) a été partiellement (de 15 à 70%) acylée sur les fonctions ϵ -NH₂ de la lysine en utilisant la D-gluconolactone, un agent également hydrosolubilisant. Le but est de réduire le nombre de charges positives sur la polylysine et par conséquent de réduire les interactions électrostatiques entre le polymère et un plasmide.

En présence de polylysine, l'ADN se condense fortement par un mécanisme coopératif entre les charges positives de la polylysine et les charges négatives de l'ADN.

La formation des complexes entre un plasmide de 5 kb tel que le plasmide pSV2Luc contenant le gène de la luciférase avec des polylysines substituées par des quantités croissantes de résidus gluconoyles est analysée par électrophorèse en gel d'aragose et les complexes ADN/polymère optimaux correspondent à ceux pour lesquels l'ADN ne migre pas en électrophorèse par suite de la totale condensation de l'ADN, sont ainsi aisément déterminés. Au-delà de 80% de substitution, la polylysine gluconoylée ne forme plus de complexe avec l'ADN.

Comme le montrent les résultats de la Figure 3, l'expression de la luciférase par les cellules HepG2 (hépatocarcinome humain) augmente avec la quantité de résidus gluconoyles fixée sur la polylysine et atteint un maximum (environ 300 fois plus qu'avec le plasmide seul) (ligne de base) lorsque la polylysine est substituée par 45 à 70% (88 à 132 résidus) gluconoyles. Les

polylysines substituées par peu ou trop de résidus gluconoyles sont pas ou peu efficaces. A titre de comparaison, l'expression de la luciférase obtenue dans ces mêmes cellules et dans les mêmes conditions en utilisant la polylysine lactolysée dans les conditions optimales, permet de conclure que la transfection obtenue avec la polylysine gluconoylée (substituée à 58%) est comparable à celle obtenue avec la polylysine lactolysée dans les conditions optimales.

La polylysine substituée par 45 à 70% (88 à 132 résidus) de gluconoyles permet de préparer des complexes ADN/polymère fortement concentrés, jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN, alors qu'avec la polylysine lactolysée, il est seulement possible de préparer des complexes 10 fois moins concentrés. Dans la figure 7, est montrée, de façon comparative, la solubilité en fonction de la concentration en ADN, des complexes ADN/polylysine ADN/polylysine gluconoylée et ADN/polylysine lactolysée. Cette étude est réalisée en mesurant la turbidité (mesure de l'absorbance à 610 nm) des différentes solutions. Les complexes ADN/polylysine et ADN/polylysine gluconoylée restent solubles jusqu'à plus de 100 $\mu\text{g/ml}$, alors qu'avec la polylysine lactolysée, les complexes précipitent à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$. En présence de polymère, l'ADN se condense fortement par suite d'un phénomène coopératif entre les charges positives et négatives des deux polymères. Dans le cas de la polylysine gluconoylée, environ 60% des charges positives étant substituées, la coopérativité des interactions électrostatiques entre l'ADN et le polymère est diminuée, ce qui facilite une dissociation des complexes ADN/polymère et en particulier un relargage de l'ADN dans la cellule et permet une bonne expression du gène. Une étude de la modification de la coopérativité des interactions électrostatiques entre l'ADN et la polylysine gluconoylée est réalisée en fonction de la force ionique et de la nature des contre ions.

Polylysine gluconoylée munie d'un signal de reconnaissance.

La polylysine gluconoylée peut être substituée par un ligand de petite masse moléculaire tel que le lactose ayant une affinité moyenne pour un récepteur membranaire ou la biotine ayant une forte affinité pour un récepteur membranaire.

Polylysine gluconoylée et lactolysée.

Lorsque la polylysine est substituée par 30 résidus de lactose, les cellules HepG2 sont très faiblement transfectées comparativement aux résultats obtenus avec la polylysine substituée par 60 résidus de lactose (Tableau I). La polylysine substituée par 30 lactoses possède encore beaucoup de charges positives,

interagit fortement avec l'ADN et ne permet pas une dissociation rapide de l'ADN du complexe. Lorsque la polylysine contenant 30 résidus de lactose est en plus substituée par 30 résidus gluconoyles, l'expression de la luciférase est élevée et comparable à celle obtenue avec la polylysine substituée par 60 résidus de lactose. L'addition de résidus gluconoyle permet de réduire les interactions électrostatiques entre l'ADN et la polylysine, facilitant une dissociation rapide de l'ADN dans la cellule.

Polylysine gluconoylée et biotinylée.

Lorsque la polylysine gluconoylée (contenant 60 résidus gluconoyles) est substituée par un très petit nombre (2.5) de résidus de biotine, les complexes ADN/polylysine biotinylée ont une très forte affinité (10^{15} l/ mole) pour la streptavidine. Si de plus la streptavidine est munie d'un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire spécifique d'un type cellulaire qui induit l'endocytose des complexes, l'ADN acquiert alors une spécificité cellulaire. Ceci est montré dans le Tableau II: le plasmide complexé par l'intermédiaire de la polylysine gluconoylée et biotinylée à de la streptavidine munie d'un signal de reconnaissance tel que la sérum albumine lactolysée reconnue et endocytée via la lectine membranaire des cellules HepG2, l'expression de la luciférase est beaucoup plus importante que lorsque la sérum albumine est dépourvue de lactose ou bien que la streptavidine est dépourvue d'un signal de reconnaissance.

Polylysine gluconoylée et transfert de gènes dans divers types cellulaires.

La polylysine substituée par 45 à 70% de gluconoyles permet de transfecter avec une bonne efficacité, des cellules adhérentes telles que des macrophages humains, un hépatocarcinome humain, des cellules endothéliales de rat mais également des cellules non adhérentes telles qu'un lymphome T humain et des cellules leucémiques de la lignée érythroïde (Figures 4 et 5).

Conclusions

Le caractère inventif de la polylysine gluconoylée repose:

- sur l'utilisation d'une polylysine partiellement substituée pour réduire les interactions électrostatiques entre l'ADN et le polycation afin de faciliter un relargage intracellulaire de l'ADN après internalisation dans la cellule par un phénomène d'endocytose non spécifique (la présence de récepteurs membranaires capables de reconnaître spécifiquement les résidus gluconoyles, n'est pas connue);

- les résidus gluconoyles agissent également comme hydrosolubilisant et permettent de préparer des complexes ADN/polylysine très concentrés et donc une meilleure utilisation *in vivo*, ce qui n'est pas le cas avec la polylysine lactolysée ou bien la polylysine substituée par des protéines comme la transferrine ou l'asialooromucoïde;

- la polylysine gluconoylée peut être utilisée pour transfecter divers types cellulaires et en particulier des cellules non adhérentes;

- la polylysine gluconoylée peut être utilisée comme polymère de base pour conférer une spécificité cellulaire à l'ADN par addition de quelques molécules de ligands de faible masse moléculaire reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques. L'avantage de la polylysine gluconoylée par rapport à la polylysine non gluconoylée réside dans le fait que celle-ci est déjà optimisée pour permettre la formation de complexes ADN/polymère-ligand facilement dissociables dans la cellule ce qui réduit le nombre de molécules de ligands à fixer sur la polylysine. En effet, on a déjà montré que l'efficacité de transfection dépend du nombre de molécules de d'oses fixées sur la polylysine non gluconoylée (60 résidus lactose ou 80 résidus galactose sont nécessaires pour une transfection optimale dans les cellules possédant un récepteur reconnu pour le lactose ou le galactose).

REVENDEICATIONS

1. Complexe entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

2. Complexe selon la revendication 1, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

3. Complexe selon la revendication 1, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives, par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

4. Complexe selon l'une des revendications 1 ou 2, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance de cellules,

5 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs étant également substituées de 0 à 40% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une
10 molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

5. Complexe selon l'une des revendications 1, 2 ou 4, entre au moins un acide nucléique chargé négativement et au moins un conjugué polymérique chargé positivement, la liaison entre l'acide nucléique et le conjugué polymérique étant de nature électrostatique, le conjugué polymérique contenant
15 un polymère formé de motifs monomères portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

20 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant ainsi la dissociation du complexe et le relargage de l'acide nucléique,

25 - les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

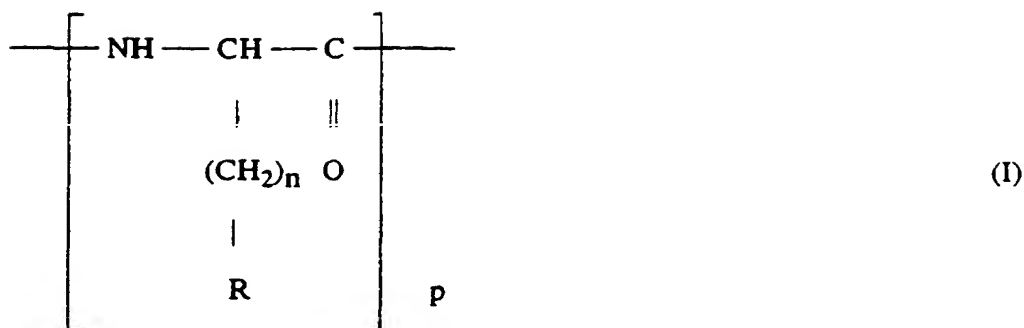
→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance membranaire cellulaire,

30 - les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs pouvant être également substituées par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance membranaire cellulaire, ce signal de reconnaissance ayant un poids moléculaire inférieur à 5000,

et lorsqu'il est présent, ce signal de reconnaissance peut l'être à raison d'une molécule pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique ou d'environ 60 molécules pour environ 10 000 motifs du conjugué polymérique.

35

6. Complexe selon l'une des revendications 1, 2, 4 ou 5, dans lequel le polymère contient un groupement polymérique de formule (I) suivante:



dans laquelle:

- . p est un nombre entier variant de 2 à 500 de préférence de 150 à 200,
- . n est un nombre entier variant de 1 à 5 et vaut de préférence 4,
- . ce groupement polymérique contenant un nombre de p radicaux R parmi

lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, notamment un reste dihydroxypropionyle, érythrononyle, thréonyle, ribonyle, arabinyle, xylonyle, lyxonyle, gluconyle, galactonyle, mannonyle, glycoheptonyle, glycooctonyle,

. m est un nombre entier de 2 à 15, de préférence de 2 à 7,

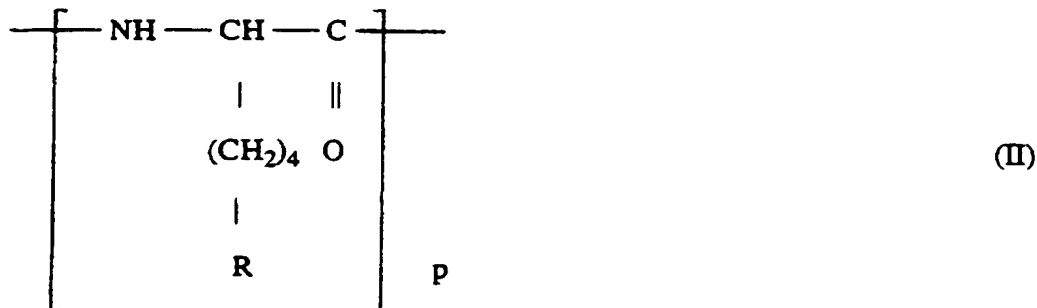
. R_1 représente H ou un radical alcoyle de 1 à 15 atomes de carbone, notamment CH_3 ,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ ,

* R pouvant en outre être constitué de 0 à 25% par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres, et notamment à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour environ 10 000 motifs,

ou à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

7. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



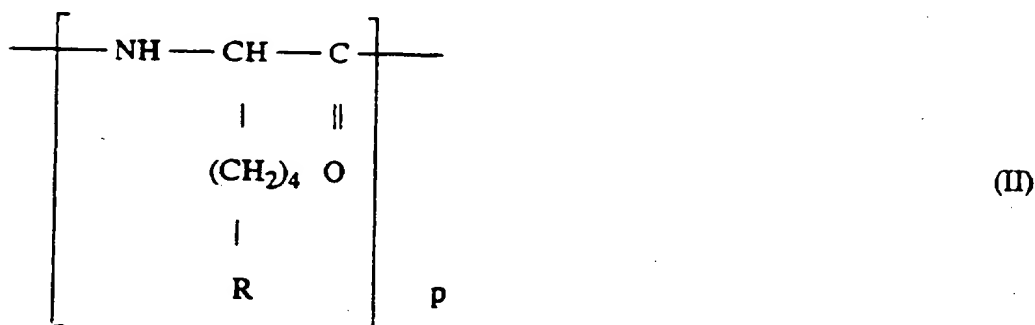
dans laquelle:

. p a les significations indiquées à la revendication 6,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ , et de 0 à 25% des radicaux R pouvant être substitués par une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

8. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



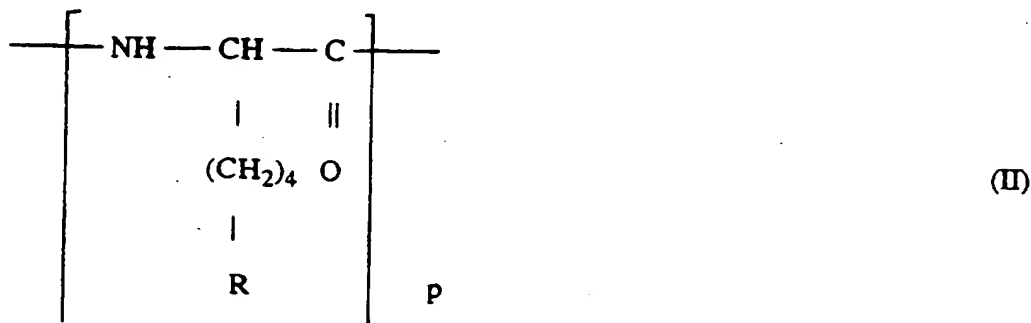
dans laquelle:

. p a les significations indiquées à la revendication 6,

* 10% à 70% du nombre des résidus R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant la signification indiquée ci-dessus,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% du nombre des radicaux R représentent NH_3^+ .

9. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

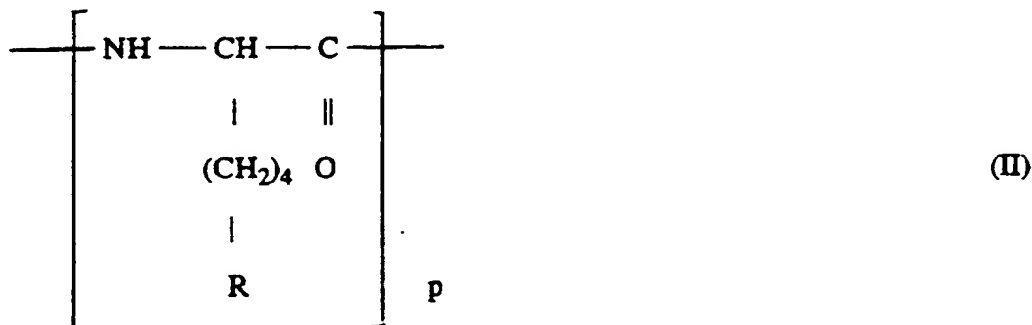
p a la signification indiquée à la revendication 6,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% des radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 0,5 à 5, avantageusement de 1 molécule pour 10 000 motifs.

10. Complexe selon la revendication 6, dans lequel le polymère comprend un groupement polymérique de formule (II):



dans laquelle:

. p a la signification indiquée à la revendication 6,

. ce groupement polymérique contenant un nombre p radicaux R parmi lesquels:

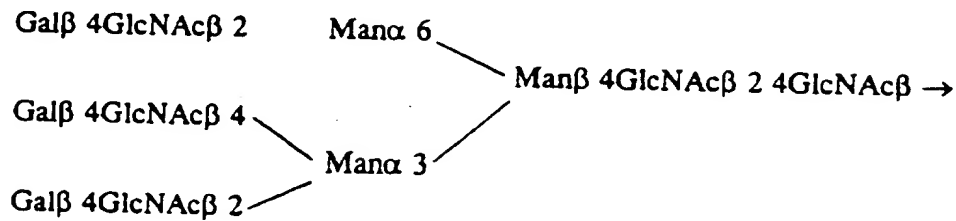
* 10% à 70% du nombre des radicaux R représentent un groupe $\text{NH-CO-(CHOH)}_m\text{-R}_1$, m et R_1 ayant les significations indiquées à la revendication 2,

* le reste des radicaux, c'est-à-dire 30% à 90% de ces radicaux R représentent d'une part NH_3^+ et d'autre part une molécule qui constitue un signal de reconnaissance à raison de 10 à 100, avantageusement de 60 molécules pour environ 10 000 motifs.

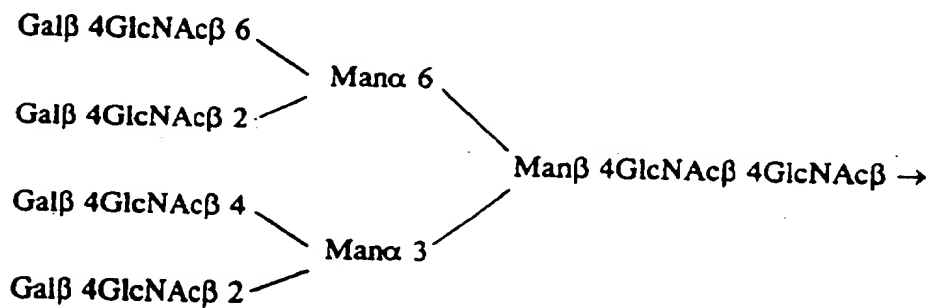
11. Complexe selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le signal de reconnaissance est choisi parmi:

A) - des osides simples ou complexes reconnus par des lectines membranaires, et choisis parmi:

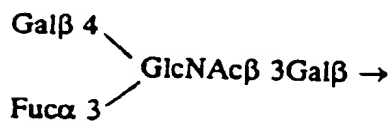
a. Asialo-oligoside de type triantennaire lactosamine: récepteur d'asialoglycoprotéine



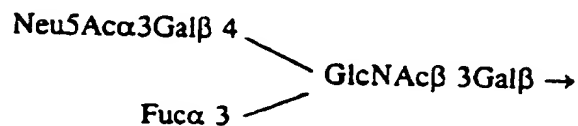
b. Asialo oligoside de type lactosamine tetraantennaire: récepteur d'asialoglycoprotéine



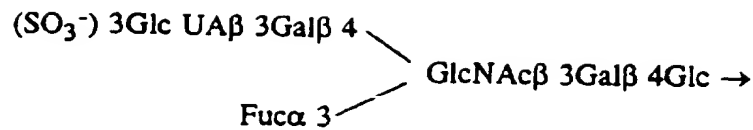
c. Lewis x: LECAM 2/3



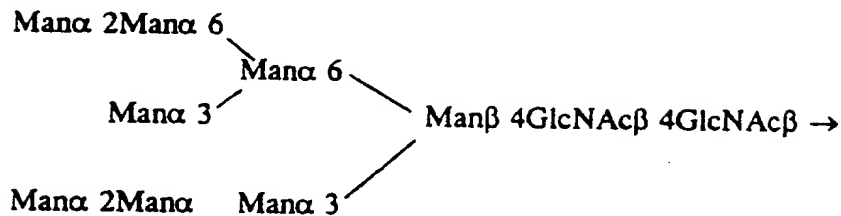
d. Lewis x sialyl: LECAM 3/2



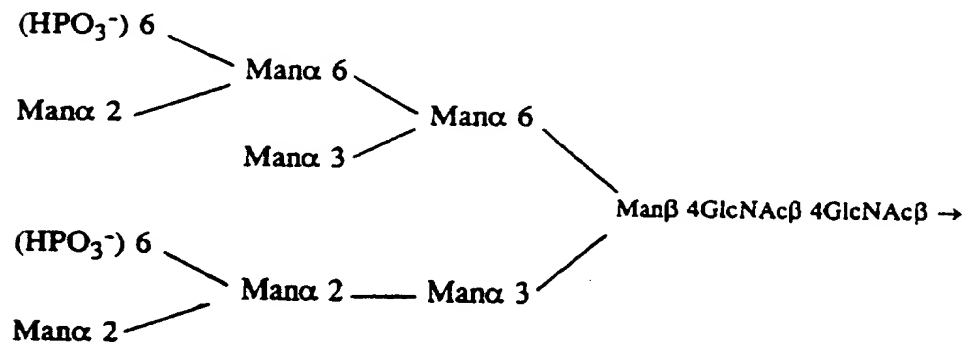
e. Dérivé de Lewis x sulfaté (HNK1): LECAM 1



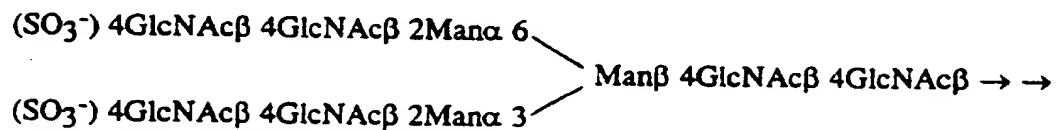
f. Oligomannoside: récepteur du mannose



g. Oligomannoside phosphorylé: récepteur de mannose 6 phosphate



h. Oligosaccharide de type lactosamine sulfaté: récepteur de GalNAc 4 sulfaté



B) des peptides

a) peptides anti-inflammatoires ou certains de leurs fragments reconnus par des récepteurs de la paroi vasculaire, tels que

- polypeptide vasodilatateur intestinal (VIP)

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH₂

- polypeptide atrial natriurétique (ANP)

SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

- lipocortine

HDMNKVLDL

- bradykinine

RPPGFSPFR;

b) peptides ligands des intégrines, tels que les peptides contenant la séquence RGD tel que le récepteur de la fibronectine;

5 c) facteurs chimiotactiques, tels que les formyl peptides et antagonistes: FMLP, (N-formyl-Met-Leu-Phé);

d) hormones peptidiques tels que

α -MSH: Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂

C) Métabolites naturels tels que:

- 10
- la biotine,
 - le tétrahydrofolate,
 - l'acide folique,
 - la carnitine.

15 12. Complexe selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique peut être choisi parmi:

a) des gènes marqueurs, tels que

- 20
- gènes contenant la luciférase,
 - gènes contenant la β -galactosidase,
 - gènes contenant la chloramphénicol acétyl transférase,
 - gènes conférant la résistance à un antibiotique, tel que l'hygromycine et la néomycine etc...;

b) des gènes à visée thérapeutique, tels que

25 d'hypercholestérolémie (foie),

- facteurs de coagulation: facteurs VIII et IX,
 - phénylalanine-hydroxylase (phénylcétonurie),
 - adénosine désaminase (immunodéficiences ADA),
 - enzymes lysosomiques, tels que la β -glucosidase dans le cas de la
- 30 maladie de Gaucher,
- dystrophine et minidistrophine (myopathie),
 - tyrosine hydroxylase (Parkinson),
 - facteurs de croissance des neurones (Alzheimer),
 - CFTR cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator
- 35 (mucoviscidose),
- alpha1-antitrypsine,
 - cytokines (interleukines, TNF facteur de nécrose des tumeurs),
 - thymidine kinase du virus Herpes simplex,

- protéines du MHC, système majeur d'histocompatibilité, en particulier HLA-B7,

- cytosine désaminase,

- gènes codant pour des ARN sens et antisens,

- gènes codant pour des ribozymes,

c) des gènes à visée vaccinale

- gènes codant pour des antigènes viraux (vaccination), par exemple: gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe.

13. Complexe selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel:

- le polymère, notamment la polylysine présente un degré de polymérisation d'environ 100 à environ 500, de préférence 190,

- les fonctions NH_3^+ libres des motifs lysine étant substituées dans un rapport de 60 par des groupements gluconoyl et éventuellement par une molécule constituant un signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité d'au moins 10^6 l mole^{-1} vis à vis du récepteur de la cellule que le complexe doit cibler ou éventuellement par 60 molécules de signal de reconnaissance pour 10 000 résidus de lysine lorsque ladite molécule signal possède une affinité inférieure à 10^4 l mole^{-1} vis à vis du susdit récepteur,

- l'acide nucléique présente un poids moléculaire d'environ $6 \cdot 10^5$ à environ $25 \cdot 10^6$, et

- le rapport entre le nombre moyen de paires de base de l'acide nucléique par molécule de motif de monomère, notamment la lysine est d'environ 0,9 à environ 1,1, de préférence d'environ 0,95 à environ 1,05.

14. Conjugué polymérique chargé positivement, contenant des motifs portant des fonctions NH_3^+ libres, notamment des résidus de lysine et étant tel que:

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs sont substituées dans un rapport d'au moins 10%, avantageusement de 45% à 70%, notamment de 60%, par des résidus non chargés entraînant une diminution des charges positives par rapport au même conjugué polymérique non substitué, facilitant le relargage de l'acide nucléique par la dissociation du complexe,

- les susdits résidus possédant en outre les propriétés suivantes:

→ ils comportent au moins un groupe hydroxyle,

→ ils ne correspondent à aucun signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire,

- les fonctions NH_3^+ libres des susdits motifs et/ou les groupes hydroxyles des susdits résidus pouvant être également substituées par au moins une molécule qui constitue un signal de reconnaissance reconnu par un récepteur membranaire cellulaire, sous réserve que le conjugué polymérique contienne au moins 30% de fonctions NH_3^+ libres.

15. Conjugué polymérique selon la revendication 14, et tel que défini selon l'une des revendications 2 à 5, ou contenant un groupement polymérique de formule selon l'une des revendications 6 à 10.

16. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 14 ou 15, pour la transfection *in vitro* ou *ex vivo* de cellules à l'aide d'un gène, notamment ceux définis à la revendication 12.

17. Utilisation d'un complexe ou d'un conjugué selon la revendication 16, caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi:

- des cellules souches hématopoïétiques;
- cellules du foie;
- cellules des muscles squelettiques;
- cellules de la peau:
 - . fibroblastes,
 - . kératinocytes,
 - . cellules dendritiques,
 - . mélanocytes.
- cellules des parois vasculaires:
 - . endothéliales;
 - . musculaires lisses;
- cellules épithéliales des voies aériennes;
- cellules du système nerveux central;
- cellules cancéreuses;
- cellules du système immunitaire, telles que des lymphocytes, des macrophages, des cellules NK etc...

18. Méthode de transfection *in vitro* ou *ex vivo*, caractérisée en ce que l'on met en présence un complexe, selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans un milieu contenant des cellules à transfecter, dans des conditions telles qu'il y a:

- passage du complexe à partir du milieu dans le cytoplasme des cellules,

- relargage de l'acide nucléique impliqué dans le susdit complexe dans le cytosol des cellules,

- transcription et expression de l'acide nucléique dans les cellules transfectées.

19. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de substance active, l'un au moins des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, ou l'un au moins des conjugués selon l'une des revendications 14 ou 15, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20. Utilisation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, ou d'un conjugué selon l'une des revendications 14 ou 15, pour la préparation d'un médicament destiné par exemple au traitement de déficience métabolique congénitale ou acquise, ou au traitement de tumeurs, ou pour la préparation d'un vaccin, par exemple vaccin contre la grippe.

21. Trousse ou kit comprenant:

- un conjugué polymérique selon l'une des revendications 14 ou 15, tel que la polylysine, substituée par un résidu entraînant une diminution des charges des groupes NH_3^+ libres, ce conjugué polymérique étant apte à comporter éventuellement un signal de reconnaissance, lequel est préalablement fixé ou non sur le susdit conjugué polymérique, ledit signal de reconnaissance étant fonction de la cellule à cibler,

- éventuellement un plasmide contenant au moins un gène à transférer, et le système de régulation du susdit gène,

- des réactifs permettant la fixation éventuelle du signal de reconnaissance sur le susdit conjugué polymérique,

- des réactifs permettant la formation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 13, entre le conjugué polymérique et le gène à transférer,

- des réactifs permettant la transfection de la cellule par le susdit complexe.

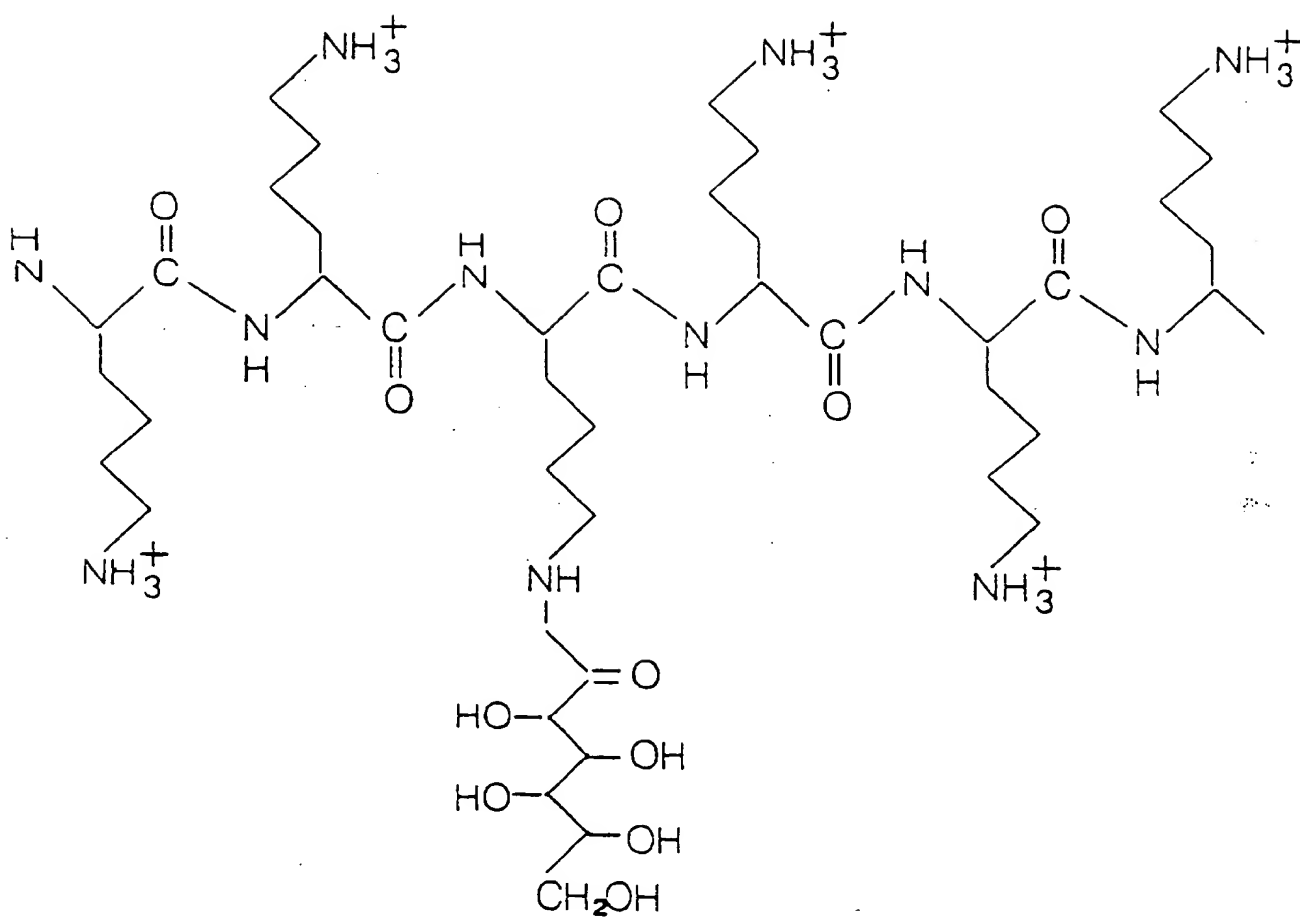


Figure 1

2/9

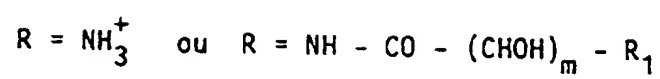
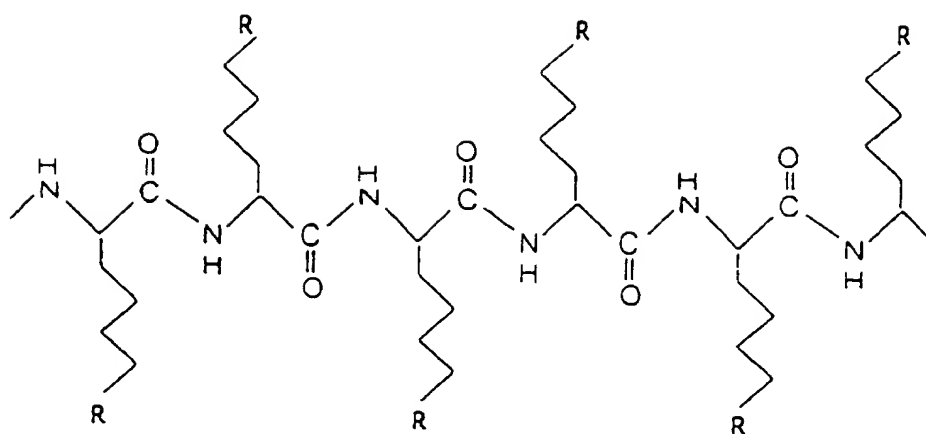


Figure 1 bis

3/9

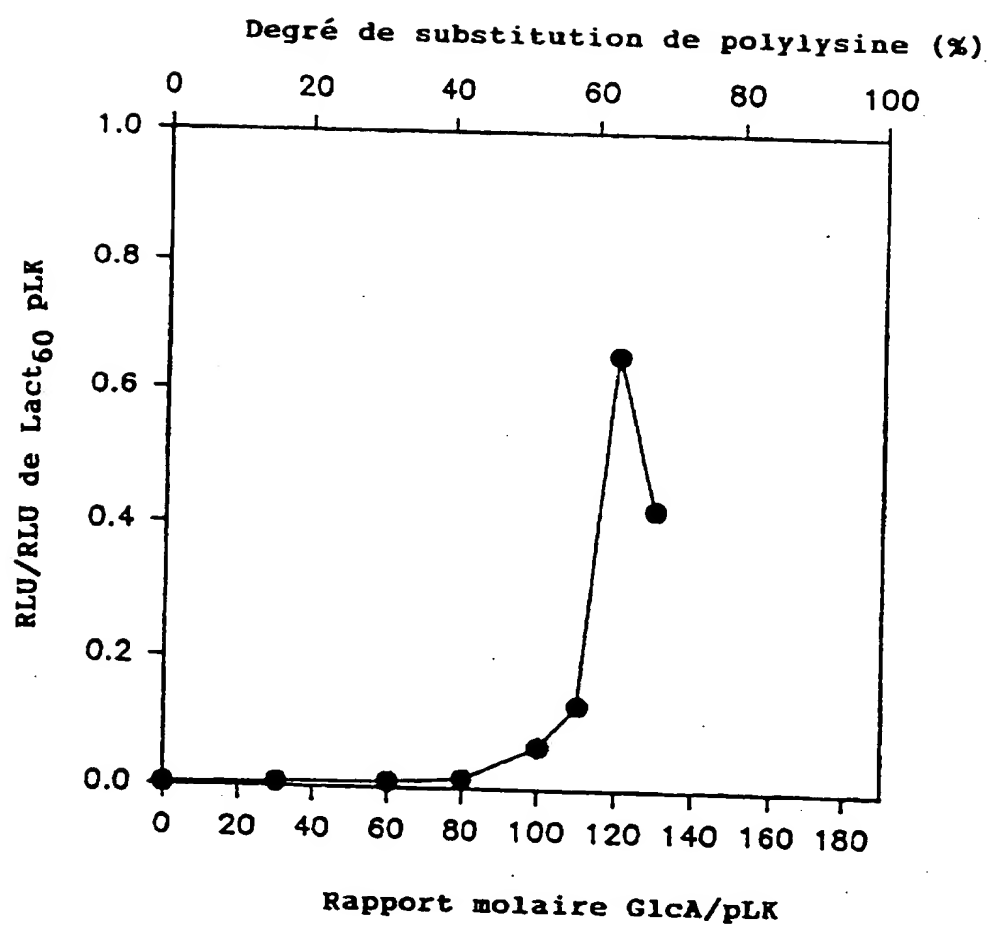


Figure 2

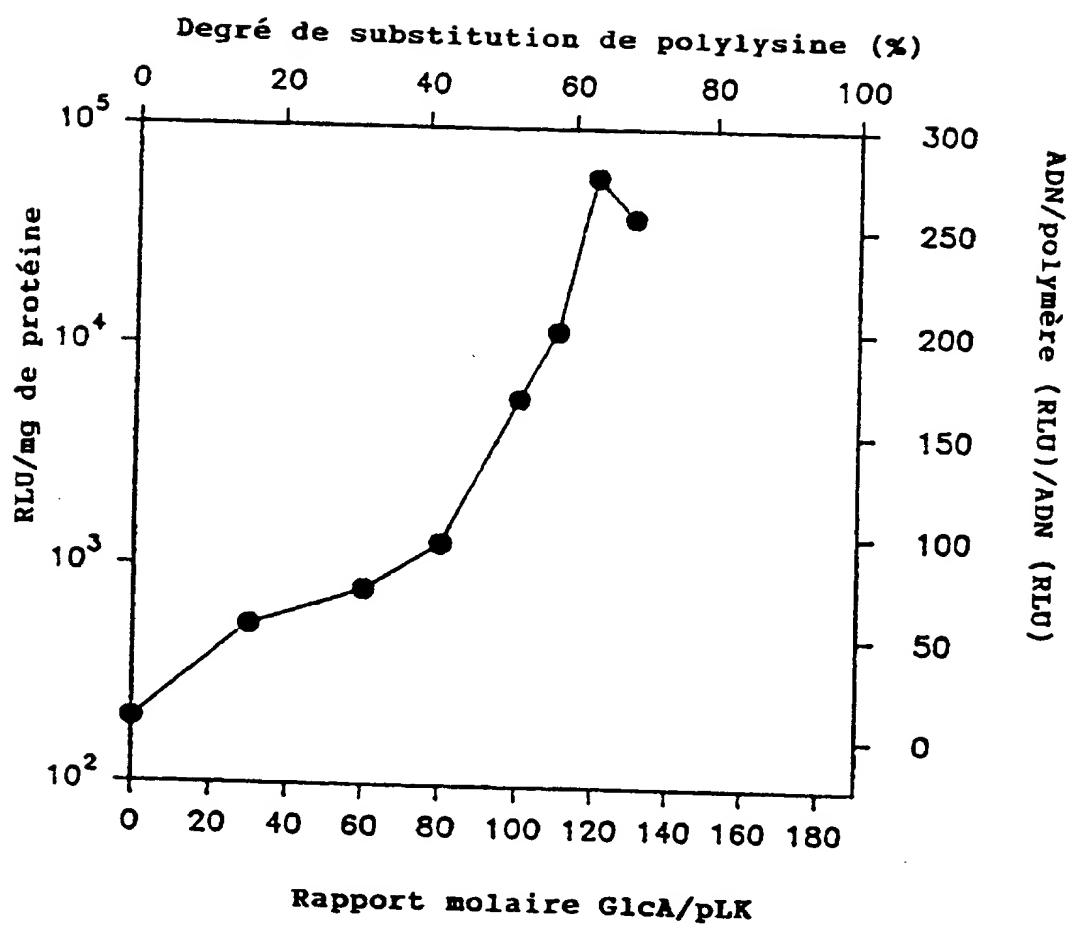


Figure 3

5/9

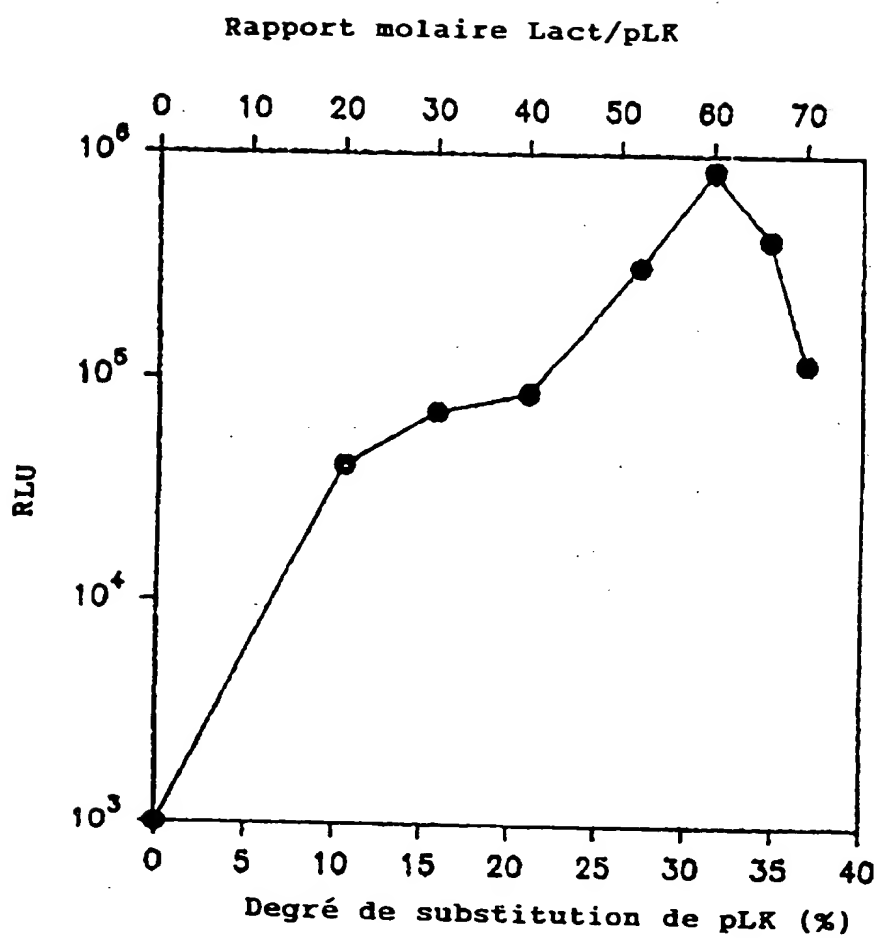


Figure 3 bis

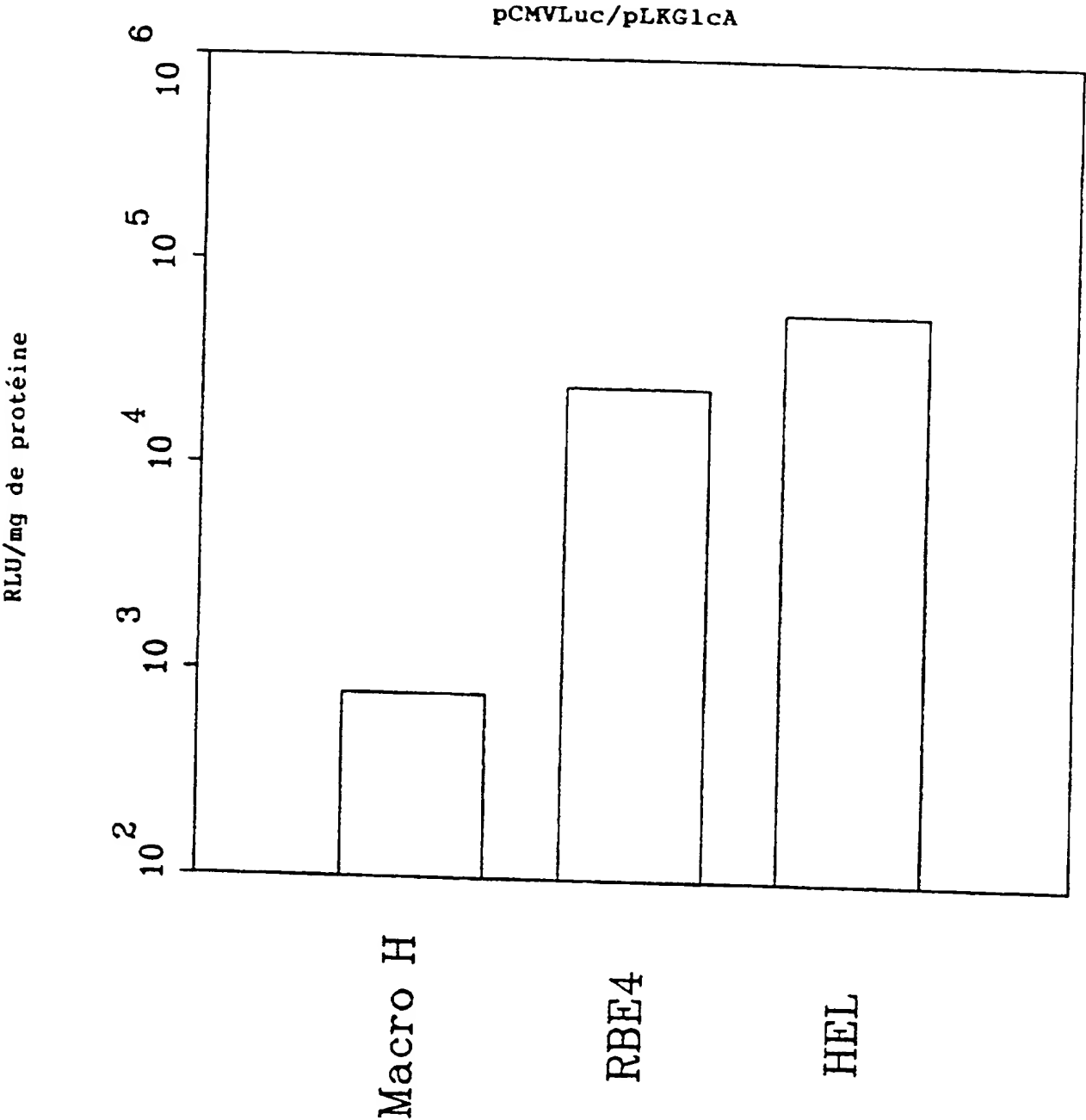


Figure 4

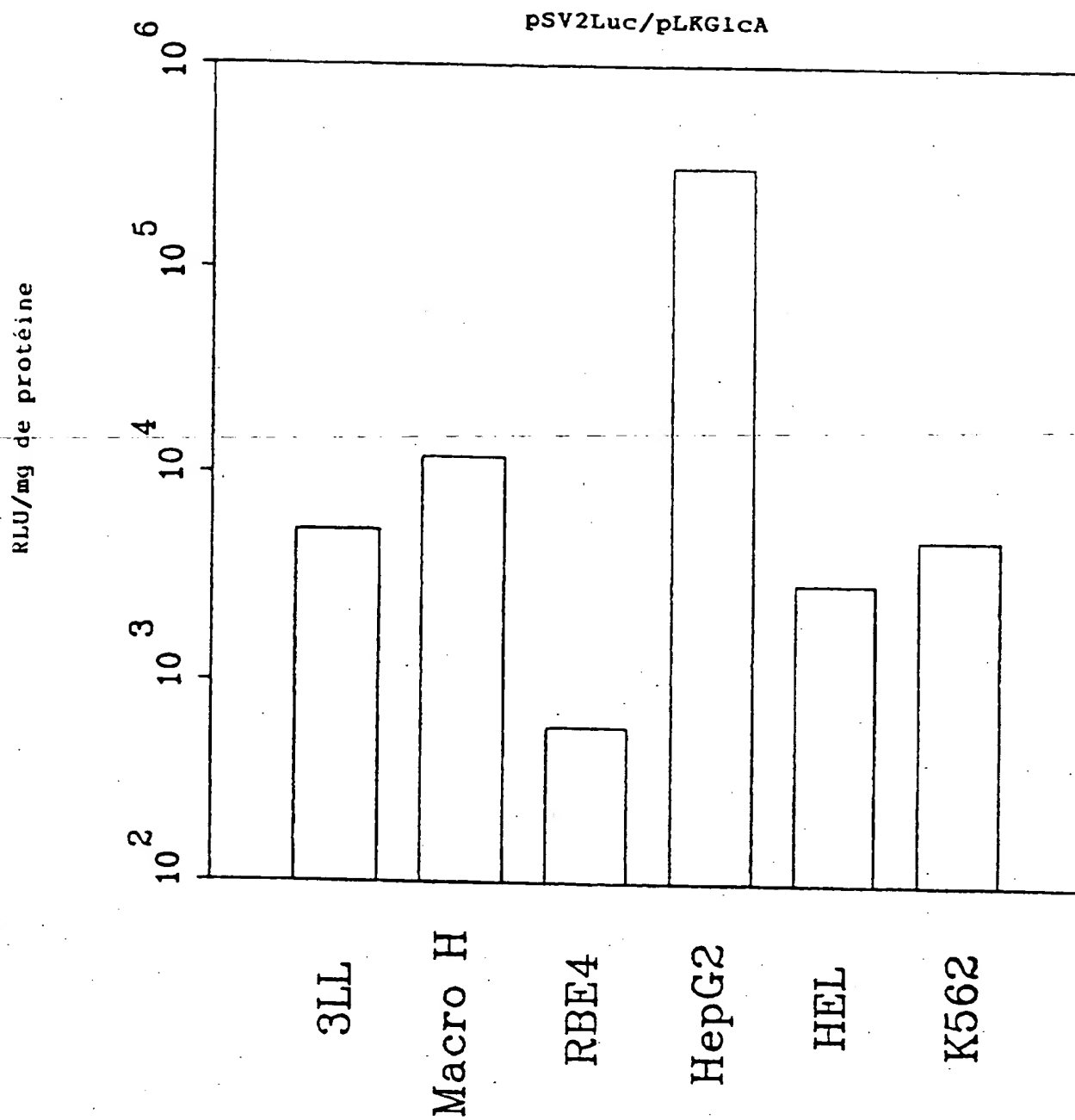


Figure 5

8/9

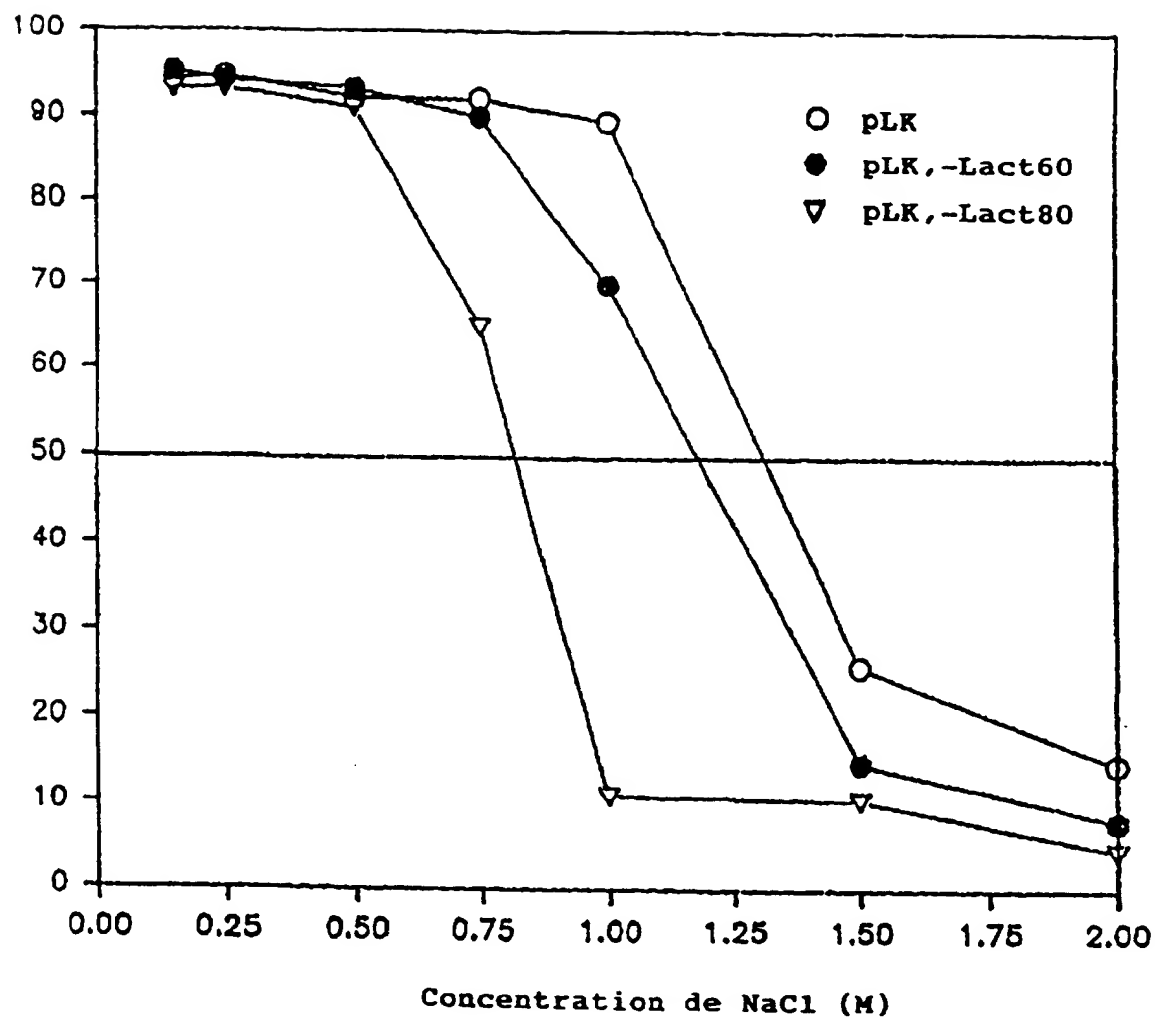


Figure 6

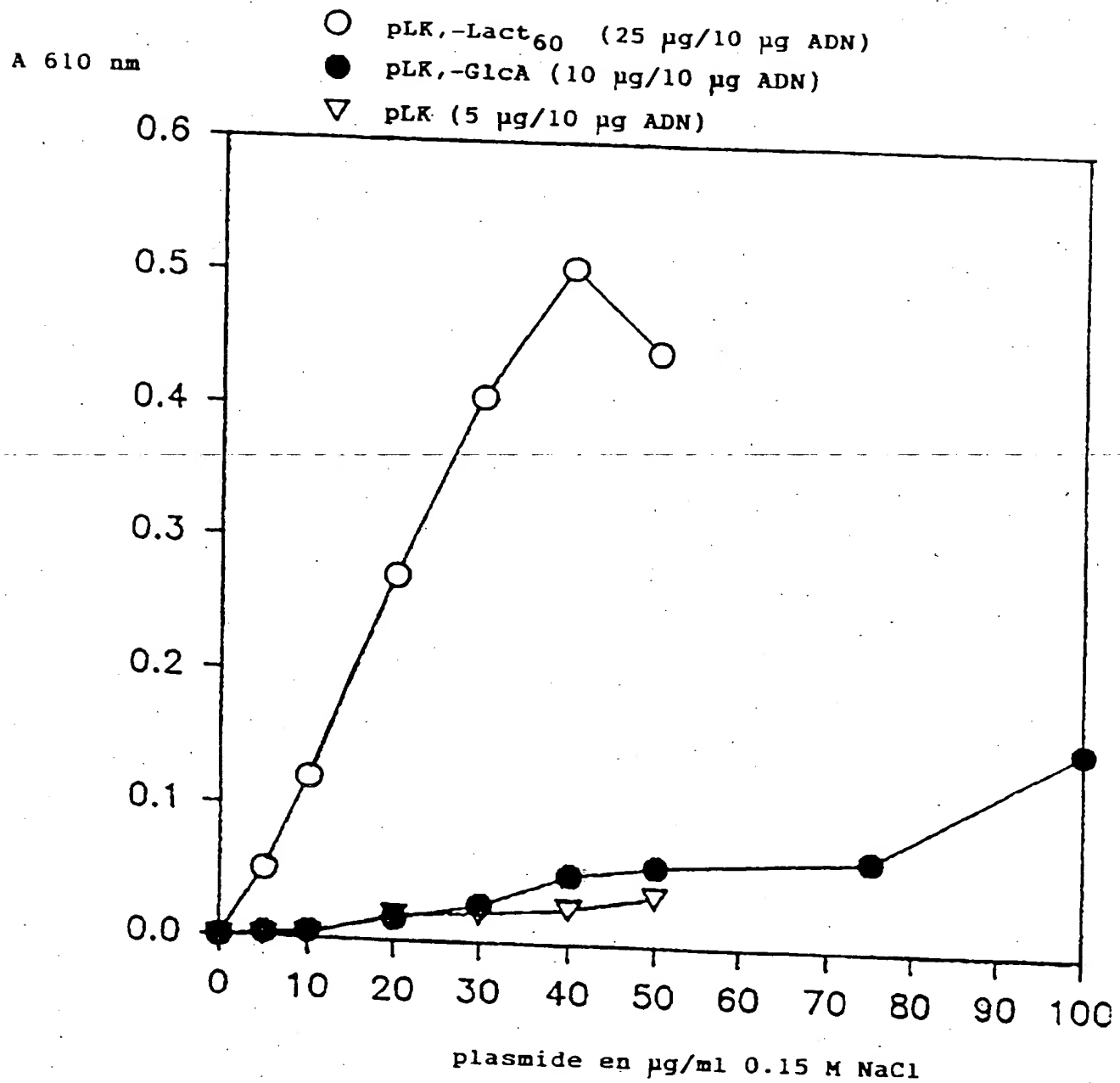


Figure 7

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 500003
FR 9405174

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-92 13570 (BOEHRINGER INGELHEIM GMBH ET AL.)	1-3, 6-8, 12
Y	* exemples 14-16 *	1-21
Y	--- TETRAHEDRON 49(32), 6991-7000, 6 Août 1993 NEGRE, E. ET AL. 'Synthesis of an allopurinol riboside-mannosylated poly-L-lysine conjugate' * le document en entier *	1-21
D, Y	--- NUCLEIC ACIDS RES. 21(4), 871-8, 25 Février 1993 MIDOUX, P. ET AL. 'Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells' * le document en entier *	1-21
A	--- BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol.167, no.3, 30 Mars 1990, DULUTH, MINNESOTA US pages 1044 - 1049 MIDOUX, P. ET AL. 'Drug targeting: anti-HSV-1 activity of mannosylated polymer-bound 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine' * figure 1 *	1-21
D, A	--- CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol.4, no.2, Avril 1992 pages 257 - 266 VARKI, A. 'Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins'	11
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
11 Janvier 1995		Andres, S
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un motif une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		